

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Microbiología**



**CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS T  
REGULADORES Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN  
PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE  
RECURRENTE-REMITENTE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Carolina Aristimuño Villamayor**

Bajo la dirección de la doctora  
Silvia Sánchez Ramón

**Madrid, 2008**

- **ISBN: 978-84-692-0079-7**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Microbiología**



**CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS T  
REGULADORES Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN  
PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE  
RECURRENTE-REMITENTE**

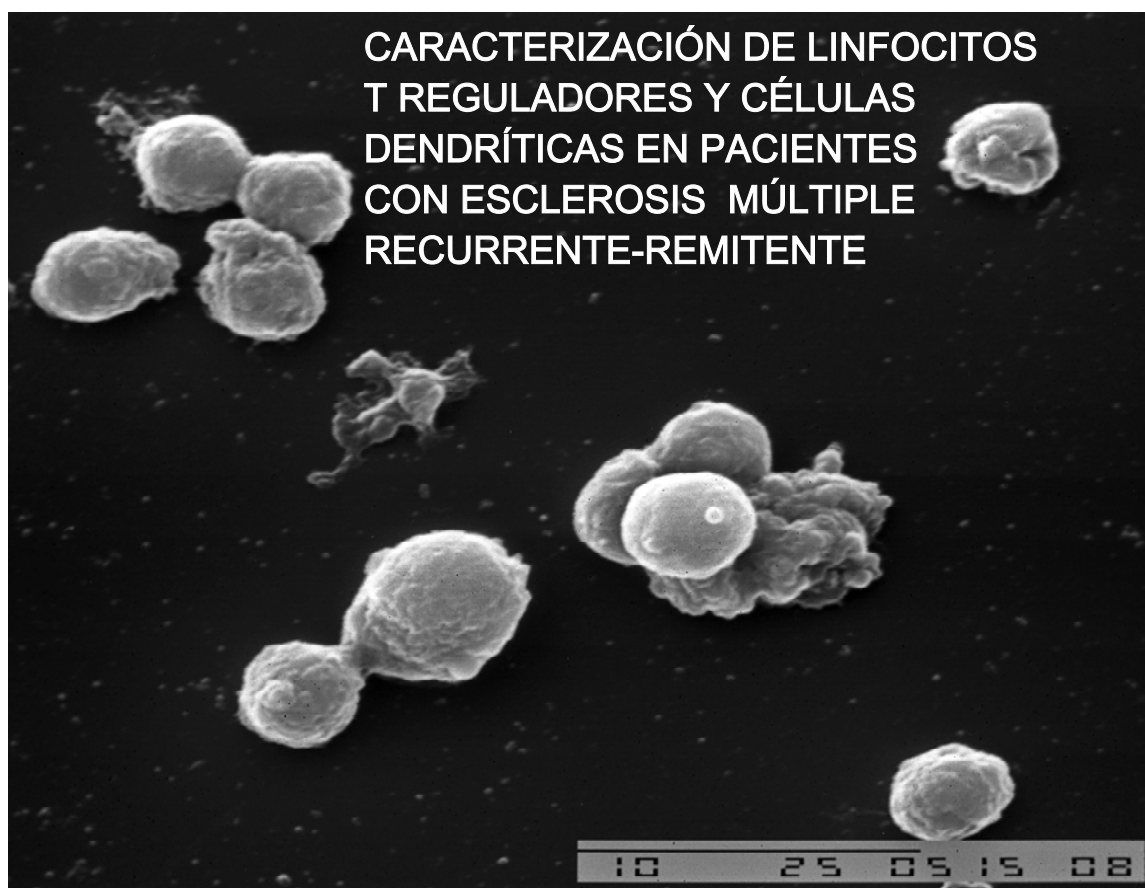
**TESIS DOCTORAL**

**CAROLINA ARISTIMUÑO VILLAMAYOR**

**Madrid, 2007**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Microbiología**



**TESIS DOCTORAL**

**CAROLINA ARISTIMUÑO VILLAMAYOR**  
Madrid, 2007

# **Tesis Doctoral**

## **Caracterización de Linfocitos T reguladores y Células Dendríticas en pacientes con Esclerosis Múltiple Recurrente-Remitente**

Esta Memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la licenciada:

Carolina Aristimuño Villamayor

### **Director de Tesis:**

Dra. Silvia Sánchez Ramón

Doctor en Medicina.

Médico Adjunto del Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” de Madrid

### **Codirector de Tesis:**

Prof. Dr. Eduardo Fernández-Cruz Pérez

Profesor Asociado del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” de Madrid

VºBº El Director

VºBº El Codirector

Esta Memoria ha sido realizada gracias a la financiación concedida por el Proyecto FIS (FIS#PI 040468), Comunidad Autónoma de Madrid (#GR/SAL/0053/2004) y la Fundación Salud 2000.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres y hermana; sois mi fuerza y mi luz. Sois toda mi vida.*

*A Raúl, el mejor “cuñado” y consejero del mundo.*

*A David, el peque de la casa, la sonrisa más bonita que he visto nunca.*

*A Viken, el amor de mi vida, mi apoyo incondicional.*

*Arriesgarse, sigue siendo la mejor manera de lograr algo en la vida*

## ***AGRADECIMIENTOS***

*En primer lugar, quiero dar las GRACIAS al Prof. Eduardo Fernández-Cruz, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio y adentrarme en el mundo de la investigación. A él le debo la realización de esta Tesis.*

*Al Dr. Joaquín Navarro, que fue mi primer maestro instructor en el campo de la inmunología, un auténtico genio, un gran amigo y compañero. Di mis primeros pasos a tu lado y me llevo muy buen recuerdo de todo lo aprendido y lo vivido.*

*A la Dra. Clara de Andrés, la neuróloga con la que hemos trabajado todo este tiempo. Ha sido un auténtico placer trabajar a tu lado, me has enseñado muchísimo. Eres una parte muy importante de esta Tesis. GRACIAS por todo. Te echaré de menos.*

*A Roseta, la mejor compañera que se puede tener. Porque tuve la suerte de conocerte y trabajar contigo y éste es uno de los mejores premios que me llevo de mi trabajo. Por tu comprensión, por tu saber escuchar, por tu amistad. GRACIAS por estar siempre ahí.*

*No puedo olvidarme de tod@s mis compañer@s del laboratorio, con los que he compartido tantas cosas durante estos años. A Paris, Nally, Anne, Alejandra, Dari, Alejandro, Bea, Ángela, Ramón, Lara, Juan Carlos, Virginia, Carmen, Jara... Al resto de residentes y compañeros nuevos. A todos los de molecular; los compis de la “habitación de al lado” (incluida la “vasca madrileña”; Arantxa). A las compañeras que ya se fueron y con las que viví mis comienzos más divertidos en el hospital (Isa y Pi). Sois geniales. Porque esta Tesis también es vuestra.*

*A la Dra. Margarita Rodríguez-Mahou, por todo su apoyo y ayuda recibida todo este tiempo. A mis compañeras de la 4ª planta; la Dra. Juana Gil y Andrea, por esos ratitos que hemos pasado juntas. A todos los técnicos del hospital (en especial a Julia, Lola, Pilar, Olga, Ana y Lina). A Mª Carmen, Celia y Mercedes.*

*A los amigos que he hecho en Madrid, que me han ayudado a no dejar de luchar; en especial a Vane y a Pablo, por ser los mejores amigos del mundo.*

*A las Dras Paloma Sánchez-Mateos y Natividad Longo, por su apoyo y sabios consejos. Y por último, la persona más importante de este trabajo, la Dra. Silvia Sánchez-Ramón; Gracias por darme la oportunidad de trabajar a tu lado. Por hacer que cada día fuera una aventura apasionante. Por el entusiasmo y la energía que desprendes. Porque hacíamos muy buen equipo juntas. Porque has sido mi maestra, consejera y amiga.*



*Gracias a todos.*





<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA	2
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	2
1.3. EDAD DE COMIENZO E INCIDENCIA POR SEXOS	5
1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	5
1.4.1. Anatomía patológica de las lesiones	5
1.4.2. Síntomas y signos de comienzo de la enfermedad	6
1.4.3. Formas evolutivas	7
1.4.4. Frecuencia de los brotes	8
1.4.5. Escalas de disfunción neurológica	9
1.5. DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE	9
1.5.1. Criterios de Poser	10
1.5.2. Criterios de McDonald	11
1.6. FISIOPATOGÉNESIS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	14
1.6.1. Inmunofisiopatología de la Esclerosis Múltiple	15
1.7. CÉLULAS DENDRÍTICAS	19
1.7.1. Implicación de las células dendríticas en la Esclerosis Múltiple	19
1.7.2. Estadios madurativos de las células dendríticas. Regulación de la migración	19
1.7.3. Presencia de células dendríticas en el Sistema Nervioso Central	21
1.7.4. Implicación de las células dendríticas en enfermedades autoinmunes	21
1.7.5. Las células dendríticas como inductoras de tolerancia	22
1.8. LINFOCITOS T REGULADORES	22
1.8.1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> reguladores	22
1.8.2. Fenotipo de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> naturales (nTreg)	23
1.8.3. Desarrollo celular de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> naturales (nTreg)	24
1.8.4. Mecanismo supresor de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> naturales (nTreg)	24
1.8.5. Implicación de los linfocitos T reguladores en la fisiopatología de la Esclerosis Múltiple	26
1.8.6. Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> reguladores inducidos (iTreg)	27
1.8.6.1. Linfocitos T reguladores inducidos productores de IL-10 (Tr1)	27
1.8.6.2. Linfocitos T reguladores inducidos Th3	28
1.8.7. Otras células reguladoras	30
1.9. TRATAMIENTOS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	32
1.9.1. Tratamiento sintomático del brote de Esclerosis Múltiple. Tratamiento con esteroides	32
1.9.2. Tratamientos que modifican el curso de la enfermedad	33
1.9.2.1. Interferón beta	33
1.9.2.1.1. Betaseron	34
1.9.2.1.2. Avonex	35
1.9.2.1.3. Rebif	35
1.9.2.2. Copaxone	36
1.9.2.3. Novantrone	37
1.9.3. Otros tratamientos alternativos	38
1.9.3.1. Tysabri	38
1.9.3.2. Gammaglobulinas policlonales	39
1.9.3.3. Azatioprina	40
1.9.3.4. Otros tratamientos inmunosupresores	40
1.9.3.5. Vacunas terapéuticas	41
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>3. SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	46
3.2. SUJETOS Y PERÍODO DEL ESTUDIO	47
3.2.1. Estudio observacional de pacientes en brote y tras tratamiento con metilprednisolona	47
3.2.2. Estudio observacional de pacientes con EMRR clínicamente estables en el estudio basal y tras 3, 6 y 12 meses de tratamiento con Interferón beta-1a	48
3.3. PROTOCOLO CLÍNICO. VARIABLES ESTUDIADAS	50
3.3.1. Diagnóstico por neuroimagen	50

3.4.	TÉCNICAS DE LABORATORIO .....	50
3.4.1.	Extracción y procesamiento de las muestras de sangre .....	50
3.4.2.	Inmunofenotipaje de las subpoblaciones de células dendríticas de sangre periférica .....	51
3.4.3.	Inmunofenotipaje de las subpoblaciones linfocitarias (CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> ) de sangre periférica .....	53
3.4.3.1.	Subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	53
3.4.3.2.	SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD8 <sup>+</sup> .....	54
3.5.	ANÁLISIS DE APOPTOSIS MEDIANTE MARCAJE CON ANEXINA-V-FITC .....	54
3.6.	ESTUDIOS DE MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS. EFECTOS DE LA METILPREDNISOLONA .....	55
3.7.	ESTUDIOS FUNCIONALES DE SUPRESIÓN DE LOS T <sub>Reg</sub> <i>ex vivo</i> SOBRE RESPUESTAS LINFOPROLIFERATIVAS .....	56
3.8.	ADICIÓN <i>IN VITRO</i> DE INTERFERÓN BETA-1A AL CULTIVO MIXTO LINFOCITARIO .....	57
3.9.	ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE MARCAJE CON CARBOXIFLUORESCHEIN DIACETATO SUCCINIMIDIL ESTER (CFSE) .....	57
3.10.	ESTUDIOS FUNCIONALES DE SUPRESIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8 <sup>+</sup> REGULADORES <i>EX VIVO</i> SOBRE RESPUESTAS LINFOPROLIFERATIVAS .....	58
3.11.	EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE Foxp3 .....	58
3.12.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	59
3.13.	TINCIÓN DE PERFORINA .....	59
3.14.	DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Y DE GRANZIMA-B .....	60
3.15.	MEDIOS, REACTIVOS .....	60
3.16.	TÉCNICAS ESTADÍSTICAS .....	60
3.16.1.	Procesamiento de los datos .....	60
3.16.2.	Distribución de las variables .....	60
3.16.2.1.	Prueba ji-Cuadrado de Pearson .....	61
3.16.2.2.	Test exacto de Fisher .....	61
3.16.3.	Análisis de supervivencia .....	61
3.16.3.1.	Método de Kaplan-Meier. ....	61
3.16.3.2.	Regresión de Cox .....	61
3.16.3.3.	Función de supervivencia .....	61
3.16.4.	Pruebas paramétricas .....	61
3.16.4.1.	Coeficiente de correlación lineal de Pearson (r) .....	62
3.16.4.2.	Análisis de la varianza .....	62
3.16.4.3.	Regresión lineal múltiple .....	62
3.16.5.	Regresión Logística .....	63
3.16.6.	Pruebas no paramétricas .....	63
3.16.6.1.	“H” de Kruskal-Wallis .....	63
3.16.6.2.	“U” de Mann-Whitney .....	63
3.16.6.3.	Análisis de correlación de Spearman (R) .....	64
3.16.6.4.	Curvas de rendimiento diagnóstico (Curvas ROC) .....	64
3.17.	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	64
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	65
4.1.	ESTUDIO OBSERVACIONAL DE LA COHORTE DE PACIENTES TRATADOS CON METILPREDNISOLONA EN EL BROTE DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....	66
4.1.1.	Subpoblaciones de células dendríticas y de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple en brote y controles sanos .....	66
4.1.2.	Efectos <i>in vivo</i> de la metilprednisolona intravenosa sobre las subpoblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple .....	68
4.1.3.	Correlaciones entre las subpoblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados y reguladores durante el brote y tras tratamiento con metilprednisolona intravenosa .....	68
4.1.4.	Subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8 <sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple en brote y controles sanos .....	71
4.1.5.	Efectos <i>in vivo</i> de la metilprednisolona intravenosa sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8 <sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple .....	71

4.1.6. Correlaciones entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> durante el brote y tras el tratamiento con metilprednisolona intravenosa	73
4.1.7. Efectos <i>in vitro</i> de la metilprednisolona sobre las subpoblaciones de células dendríticas (mCDs y pCDs), linfocitos T activados y en reposo	74
4.1.8. Efectos <i>in vitro</i> de la metilprednisolona sobre la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos	75
4.2. ESTUDIO OBSERVACIONAL LONGITUDINAL DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON EMRR EN REMISION EN LOS QUE SE INICIA TRATAMIENTO CON INTERFERÓN BETA-1a	75
4.2.1. Subpoblaciones de células dendríticas y de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos	77
4.2.1.1. Subpoblaciones de células dendríticas y de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en respondedores y no respondedores	77
4.2.2. Efectos <i>in vivo</i> del Interferón beta-1a sobre las subpoblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple	77
4.2.2.1. Efectos <i>in vivo</i> del Interferón beta-1a sobre las subpoblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica de pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento	80
4.2.3. Subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8 <sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos	84
4.2.3.1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8 <sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con Interferón beta-1a	84
4.2.4. Efectos <i>in vivo</i> del Interferón beta-1a sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8 <sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple	84
4.2.4.1. Efectos <i>in vivo</i> del Interferón beta-1a sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> de sangre periférica en pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento	88
4.2.5. Correlaciones entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> en el estudio basal y al año de tratamiento con Interferón beta	90
4.2.6. Aumento de la función supresora de los T <sub>Reg</sub> <i>ex vivo</i>	92
4.2.7. Aumento de la función supresora de los T <sub>Reg</sub> <i>in vitro</i>	93
4.2.8. Estudios de linfo-proliferación mediante marcaje con Carboxifluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE)	95
4.2.9. Estudios funcionales de supresión de los linfocitos T CD8 <sup>+</sup> reguladores <i>ex vivo</i> en reacción mixta linfocitaria	96
4.2.10. Cambios en los niveles séricos de citocinas en los pacientes a los 12 meses del tratamiento con Interferón beta-1a	97
4.2.11. Factor predictivo de respuesta al tratamiento con Interferón beta	97
4.2.11.1. Análisis multivariante: regresión logística	97
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>100</b>
5.1. ESTUDIO OBSERVACIONAL DEL TRATAMIENTO CON METILPREDNISOLONA EN EL BROTE DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE	101
5.2. ESTUDIO OBSERVACIONAL LONGITUDINAL DE UN AÑO EN PACIENTES CON EMRR EN LOS QUE SE INICIA TRATAMIENTO CON INTERFERÓN BETA-1a	107
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>118</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>121</b>

***ABREVIATURAS***

<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica	<b>EMSP</b>	Esclerosis Múltiple secundariamente progresiva
<b>BLCLS</b>	Líneas celulares de linfocitos B inmortalizados con virus de Epstein-Barr	<b>FCS</b>	Suero de ternera fetal
<b>BO</b>	Bandas oligoclonales	<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína.
<b>CD</b>	Célula dendrítica	<b>FSC</b>	Tamaño (“ <i>Forward Scatter</i> ”)
<b>CFSE</b>	Carboxifluorescein diacetato succinimidil ester	<b>GADPH</b>	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
<b>CML</b>	Cultivo mixto linfocitario	<b>GAM</b>	Glucoproteína asociada a la mielina
<b>CPH</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad.	<b>GCs</b>	Glucocorticoides
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangre periférica.	<b>GMO</b>	Glucoproteína mielínica del oligodendrocito
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígenos	<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto.	<b>IFN</b>	Interferón
<b>CSF-1</b>	Factor estimulador de colonias-1	<b>IFN<math>\beta</math></b>	Interferón beta
<b>CTL</b>	Linfocito T citotóxico.	<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>CXCR</b>	Receptor de CXC quimiocinas	<b>IL</b>	Interleuquina
<b>DE</b>	Desviación estándar	<b>iT<sub>Reg</sub></b>	Linfocitos T reguladores inducidos
<b>dNTP</b>	Deoxinucleótido trifosfato	<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>EDSS</b>	Escala de Discapacidad Ampliada de kurtzke	<b>LMP</b>	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
<b>e.e.m</b>	Error estándar de la media.	<b>mCD</b>	Célula dendrítica mieloide (“ <i>Myeloid dendritic cell</i> ”)
<b>ELISA</b>	Enzimoinmunoanálisis.	<b>MFI</b>	Intensidad media de fluorescencia (“ <i>Mean Fluorescence Intensity</i> ”)
<b>EM</b>	Esclerosis Múltiple	<b>MMP</b>	Metaloproteasas de la matriz
<b>EMA</b>	Encefalomielitis aguda	<b>MPiv</b>	Metilprednisolona intravenosa
<b>EMB</b>	Esclerosis Múltiple benigna	<b>NAA</b>	N-acetil aspartato
<b>EMCD</b>	Esclerosis Múltiple clínicamente definida		
<b>EMPP</b>	Esclerosis Múltiple primariamente progresiva		
<b>ERM</b>	espectroscopia por RMN		
<b>EMRR</b>	Esclerosis Múltiple Recurrente Remitente		

<b>nT<sub>Reg</sub></b>	Linfocitos T reguladores naturales (“ <i>natural T<sub>Reg</sub></i> ”)	<b>TLR</b>	Receptores de tipo Toll (“ <i>Toll like receptors</i> ”)
<b>pb</b>	Pares de bases		
<b>PBM</b>	Proteína básica de la mielina	<b>TMR</b>	tasa de transferencia de magnetización por RMN
<b>PBS</b>	Solución fosfato-salina	<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>pCD</b>	Célula dendrítica plasmacitoide (“ <i>Plasmacytoid dendritic cell</i> ”)	<b>T<sub>Reg</sub></b>	Linfocitos T reguladores
		<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión vascular
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa		
<b>PE</b>	Ficoeritrina		
<b>PerCP</b>	Proteína peridinin clorofila		
<b>PLP</b>	Proteína proteolípido		
<b>RI</b>	Rango intercuartílico		
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear		
<b>RR</b>	Riesgo relativo		
	Reacción en cadena de la		
<b>RT-PCR</b>	polimerasa con transcriptasa reversa		
<b>SB</b>	Sustancia blanca		
<b>SCA</b>	Síndrome clínico aislado		
<b>SDF-1</b>	Factor derivado de células del estroma-1		
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central.		
<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico		
<b>SPECT</b>	Tomografía computarizada por emisión de fotón único		
<b>SRM</b>	Espectroscopia de resonancia magnética		
<b>SSC</b>	Complejidad (“ <i>Side scatter</i> ”)		
<b>TBS</b>	Tampón salino.		
<b>TC</b>	Tomografía computarizada		
<b>TCR</b>	Receptor clonotípico de células T		
<b>TE</b>	Tris EDTA.		
<b>TGF-β:</b>	Factor de crecimiento transformador β		
<b>Th</b>	Respuesta T colaboradora (“ <i>T helper</i> ”)		



## ***1. INTRODUCCIÓN***

## **1.1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA**

La esclerosis múltiple (EM) fue definida como entidad clinicopatológica hace más de 130 años. Las primeras descripciones anatomopatológicas se deben a Cruveilhier (1835) y Carswell (1838), pero fue el neurólogo francés Jean-Martin Charcot quien, en 1868, ofreció la primera descripción detallada de los aspectos clínicos y evolutivos de la enfermedad, realizando la correlación anatomoclínica y acuñando el concepto de “esclerosis en placas”, nombre con el que aún se conoce esta enfermedad en la bibliografía francesa, y que hace referencia a los hallazgos histológicos macroscópicos. Los autores ingleses la denominaron “esclerosis diseminada”, aludiendo a la diseminación de las lesiones en el sistema nervioso central (SNC) y, posteriormente, los autores norteamericanos la llamaron esclerosis múltiple, siendo esta última denominación la más empleada en la bibliografía actual, dado que alude, por una parte, a la existencia de lesiones múltiples en el SNC y, por otra, a la existencia habitual de episodios múltiples de disfunción neurológica (Fernández, 1990; Noseworthy et al., 2000).

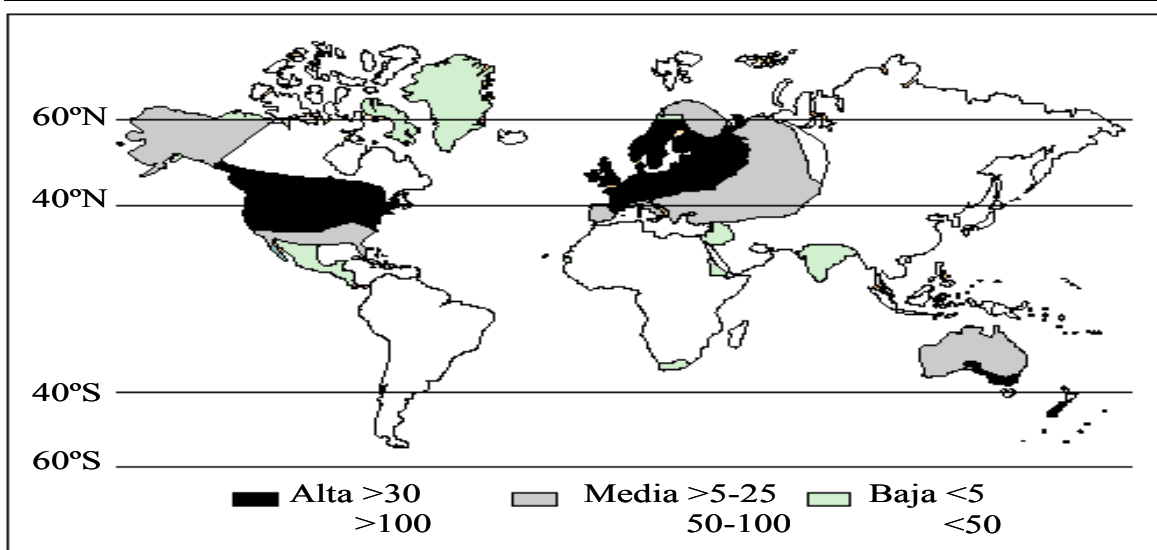
## **1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La EM se define como una enfermedad desmielinizante crónica caracterizada por lesiones multifocales preferentemente en la sustancia blanca (SB) del SNC. La EM es la enfermedad neurológica más frecuente en adultos jóvenes (Hafler, 2004) en Europa y Norteamérica, con una incidencia creciente en líneas generales en todo el mundo.

El neurólogo norteamericano John Kurtzke, en 1975, planteó la existencia de áreas geográficas con distinta prevalencia de EM, de forma que la prevalencia de la enfermedad aumentaría conforme nos alejáramos del Ecuador (Kurtzke, 1975). Kurtzke definió zonas de riesgo alto ( $>30$  casos/100.000 habitantes), riesgo medio (5-25 casos/100.000 habitantes) y bajo ( $<5$  casos/100.000 habitantes) en los años 1970-1980. Las zonas de alto riesgo presentarían tasas superiores a 30 casos por 100.000 habitantes y abarcan Norteamérica, Centro y Norte de Europa y el sur de Australia y Nueva Zelanda. España estaría englobada en la zona de riesgo medio, junto al resto de la Europa mediterránea, sur de EEUU y Norte de Australia y Nueva Zelanda, con prevalencias esperadas entre 5 y 30 casos por 100.000 habitantes. Los países asiáticos, África y Latinoamérica serían zonas de bajo riesgo, con prevalencias inferiores a 5 por 100.000 habitantes.

Estudios posteriores han demostrado aumentos muy llamativos en las tasas de prevalencia, definiéndose las zonas de riesgo en  $>100$ , de 50-100 y  $<50$  casos/100.000 habitantes. A pesar de estas variaciones de la prevalencia, sigue manteniéndose el gradiente hacia el ecuador detectado en Europa, Estados Unidos, Japón, Australia y Nueva Zelanda. (Kurtzke, 1995b; Weinshenker, 1996). No obstante, aunque en líneas generales se mantiene la existencia de un gradiente de latitud norte-sur, se ha demostrado que pueden existir grandes diferencias de prevalencia en áreas geográficamente cercanas, como Sicilia (prevalencia de 53,3 casos por 100.000) y Malta (cifras de sólo 4,2 casos por 100.000) (Dean et al., 1979) o en áreas de la misma latitud aunque más alejadas (en Rochester, 173 casos por 100.000; mientras que en Londres, Ontario, de 94 y en Newfoundland, de 55, regiones todas ellas situadas en el Norte de EEUU o Canadá). Existe una distribución de características irregulares a lo largo del mundo, detectándose mayores frecuencias entre los 40-60° de latitud norte. En Europa, las prevalencias son elevadas, entre 100-150 casos/100.000 habitantes en el Reino Unido y países escandinavos, al igual que en EEUU y Canadá (Figura 1) (Weinshenker et al., 1989). En España, la tasa de prevalencia es medio-alta, aunque se han incrementado notablemente los casos diagnosticados en los últimos diez años, con 50-60 casos/100.000 habitantes (Weinshenker and Rodriguez, 1994).

**Figura 1.** Estudios de prevalencia. La distribución geográfica de la esclerosis múltiple. Las áreas en negro corresponden a las zonas de prevalencia alta (100 casos por 100.000 habitantes), las áreas en gris corresponden a zonas de prevalencia media (50-100 casos por 100.000 habitantes) y las áreas en verde a zonas de prevalencia baja ( $<50$  casos por 100.000 habitantes). Las áreas en blanco son las zonas en las que no se dispone de datos o no hay prevalencia de la enfermedad. Modificado de Medicine, vol 08, 96, 5179-5184, 3 Marzo 2003.



Estudios epidemiológicos han establecido poblaciones aparentemente resistentes a la EM, como en el caso de los lapones, maoríes de Nueva Zelanda, indios de Norteamérica, frente a la población escandinava que es la más afectada (Weinshenker et al., 1989; Cottrell et al., 1999; Kurtzke, 1995a; Compston, 1990). Poser estableció la teoría según la cual la EM se produciría en poblaciones con antecedentes escandinavos, como Inglaterra, Groenlandia, Islandia, Irlanda, EEUU, Francia e incluso España, por las invasiones vikingas al norte de Galicia, en la zona del estrecho de Gibraltar y en otras regiones por el efecto de las migraciones, como Cataluña.

La evidencia de una base genética proviene de los datos sobre concordancia en gemelos monocigóticos (hasta el 40% en EM) frente a los dizigotos, en un 4-6% según los autores. Un componente genético biológicamente relevante está implicado también en la agregación familiar de pacientes y en las diferentes tasas de incidencia entre los diferentes grupos étnicos (Ebers et al., 1996). Estudios genéticos de ligamiento y asociación han localizado al determinante genético en el brazo corto del cromosoma 6 del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH). Se asocia fuertemente con el alelo DR2 y el gen HLA-DRB1 en el cromosoma 6p21 ha sido descrito como el más importante factor genético en relación a la susceptibilidad a la EM (Sawcer et al., 1996). Este mismo año, Hafler *y cols.* han demostrado desde una aproximación de genética poblacional la dominancia del locus CPH en la base genética de la EM, con una baja contribución de dos genes: IL2RA, (CD25), que codifica la subunidad alfa del receptor de la interleuquina-2 en el cromosoma 10p15; y IL7RA, que codifica la cadena alfa del receptor de la IL-7 en el cromosoma 5p13 (Hafler et al., 2007).

Otros factores que se pueden asociar a la EM son los siguientes: Climas fríos, con gran número de precipitaciones y por tanto de humedad; la ingesta abundante de grasa de origen animal, actualmente en debate; la infección por virus (varicela zoster, herpes virus tipo 6, virus del Epstein-Barr, encefalitis por HLTV-I) (Martínez-Cáceres, 1998). No se conoce con exactitud la tasa de mortalidad, aunque se ha estimado recientemente que está en torno a 0,35 fallecimientos por cada 100.000 habitantes y año.

De forma general, se considera que en aquellos sujetos genéticamente predispuestos sobre los que incide cierto factor ambiental desconocido, se ponen en marcha una cascada de reacciones inmunológicas que desencadenan el brote de EM.

### **1.3. EDAD DE COMIENZO E INCIDENCIA POR SEXOS**

Rara vez comienza antes de 15 o 16 años y alcanza su pico máximo de prevalencia entre los 25 y los 35 años. Es más común en mujeres (60%) que en hombres (40%), en una proporción de 1,5.

### **1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La SB del SNC contiene alrededor de un 46% de axones, 24% de mielina, 17% de glía y un 13% de vasos sanguíneos, sangre y fluidos tisulares. Los axones mielinizados del SNC son los responsables de propagar de forma más rápida y eficiente los impulsos eléctricos saltatorios. Ello se debe a su aislamiento mediante la vaina de mielina y a la presencia de gran densidad canales de  $\text{Na}^+$  que intervienen en la despolarización de la membrana, mientras que los canales de  $\text{K}^+$  localizados en la región yuxta-nodal e inter-nodal, mantienen la polaridad y la estabilidad eléctrica. La disrupción de la mielina y/o del axón son los responsables de la disfunción clínica. Los síntomas del brote serían debidos a la lesión inflamatoria de la mielina en áreas clínicamente elocuentes, lo que induciría un bloqueo en la conducción de las fibras nerviosas y ocasionalmente se dañarían el axón y las neuronas. La remisión de los síntomas del brote al inicio de la enfermedad se atribuye a la resolución de la inflamación, a la redistribución de los canales iónicos en el axón, a los procesos reparativos locales como la remielinización y a fenómenos plásticos corticales. Una vez resuelto el proceso inflamatorio, la persistencia de los síntomas se debería a la pérdida crítica de mielina, y posteriormente de axones y de las neuronas. En la fase crónica de la enfermedad, los cambios inflamatorios son menos frecuentes. El agotamiento de los mecanismos compensatorios del SNC, la lesión crítica de un cierto número de axones implicados en una determinada función neurológica y la degeneración walleriana progresiva, son el sustrato de la discapacidad funcional clínica permanente y progresiva.

#### **1.4.1. Anatomía patológica de las lesiones**

La EM se caracteriza por la aparición de lesiones focales en la SB, denominadas placas, en las que lo más llamativo es la pérdida de mielina (desmielinización) con preservación relativa de los axones, pues siempre existe un grado variable de destrucción axonal (Lassmann and Vass, 1995; Ferguson et al., 1997; Trapp et al., 1998; Morris, 2000). Estas lesiones pueden ser múltiples y están distribuidas por todo el SNC, es

característica su disposición perivenular y se localizan más frecuentemente en la SB periventricular y subpial. Su tamaño es variable, en general no mayor de 1,5 cm de diámetro, y tienden a coalescer, dando como resultado placas de mayor tamaño. Pueden aparecer placas en la sustancia gris, pero son más difíciles de identificar; las neuronas suelen permanecer indemnes.

Las placas de desmielinización son de dos tipos, según la fase de la enfermedad, y permiten distinguir una lesión aguda, en la que el fenómeno anatomopatológico fundamental es la inflamación, y una lesión crónica, en la que destacan la desmielinización, la degeneración axonal y la gliosis.

La **lesión aguda** presenta bordes mal definidos, con un considerable infiltrado inflamatorio, preferentemente de linfocitos T y B y macrófagos, en los que aparecen restos de mielina en distintas fases de digestión. Se produce además pérdida de oligodendrocitos, con degradación de las vainas de mielina, degeneración axonal en grado variable y, posteriormente, proliferación de astrocitos.

La **lesión crónica** es la lesión típica de la anatomía patológica macroscópica, en la que existe poca actividad inflamatoria, pero con una importante pérdida de vainas de mielina y de oligodendrocitos, mostrándose los axones desmielinizados, en ocasiones degenerados, con formación de redes de prolongaciones astrocitarias. Las localizaciones preferentes de estas lesiones son el nervio óptico, las regiones periventriculares, el tronco encefálico y la médula espinal.

#### **1.4.2. Síntomas y signos de comienzo de la enfermedad**

El síntoma de comienzo más frecuente es la alteración de la sensibilidad (45%), consistente en la aparición de sensación de pinchazos u hormigueo (parestias) o acorchamiento en uno o más miembros, o del tronco, sugestivo de afectación del haz espinotalámico. La alteración motora es también muy frecuente (40%) y se caracteriza por la pérdida de fuerza en uno o más miembros: El paciente arrastra uno o los dos pies al caminar y presenta torpeza o debilidad en una o las dos manos. Las alteraciones visuales, por afectación del nervio o del quiasma óptico, son también características. En el curso de la enfermedad suele resultar afectada la mayor parte de los sistemas funcionales neurológicos (piramidal, sensitivo, cerebeloso, tronco encefálico, esfinteriano, visual, mental), siendo las alteraciones motoras (90%), sensitivas (77%) y cerebelosas (75%) las más frecuentes, seguidas en orden decreciente por las alteraciones

del tronco encefálico, esfinterianas, mentales y visuales. Los casos evolucionados de EM muestran con mucha frecuencia una combinación de síntomas y signos que indican la afectación de varios sistemas neurológicos (Carretero Ares et al., 2001).

### **1.4.3. Formas evolutivas**

El curso clínico de la enfermedad es muy variable y difícil de predecir al comienzo de la misma, desde formas benignas a formas fulminantes o malignas. En el 80% de los casos el curso inicial se caracteriza por síntomas de disfunción neurológica con recaídas o brotes recurrentes “formas recurrentes–remitentes” (RR). El brote de EM se denomina también recaída o exacerbación, concepto clínico que define la aparición de síntomas o signos nuevos de disfunción neurológica de duración superior a 24 horas o el deterioro significativo de síntomas preexistentes que habían estado estabilizados durante al menos 30 días.

Alrededor de un 40-50% de estos pacientes en los siguientes 10-15 años siguen un curso de deterioro de disfunción neurológica progresivo “formas secundariamente progresivas”(SP) y entre un 10-20% de los pacientes el curso de la enfermedad es de progresión de la disfunción neurológica desde el inicio “formas primariamente progresivas” (PP) (Compston and Coles, 2002). Menos frecuentes son los casos de afectación inflamatoria inmunológica de curso clínico monofásico, es decir, con un solo episodio de desmielinización del SNC, que según la topografía de las lesiones se les ha tipificado como “encefalomielitis aguda” (EMA), mielitis, neuritis óptica o neuromielitis óptica. La EMA ocurre más frecuentemente en niños y suele ocurrir tras enfermedad vírica o postvacunal (Dale et al., 2000; Tenenbaum et al., 2002). En resumen, las diferentes formas evolutivas de la EM son las siguientes (Figura 2):

**Remitente-recurrente (RR):** Presencia de brotes con posterior recuperación completa o parcial. Los períodos entre los brotes se caracterizan por la ausencia de progresión de la enfermedad. Es la forma inicial en el 80% de los pacientes.

**Primaria-Progresiva (PP):** Enfermedad progresiva desde su inicio con posibilidad de estacionarse en ocasiones e incluso presentar mejoría. Aparece en el 10% de los sujetos enfermos.

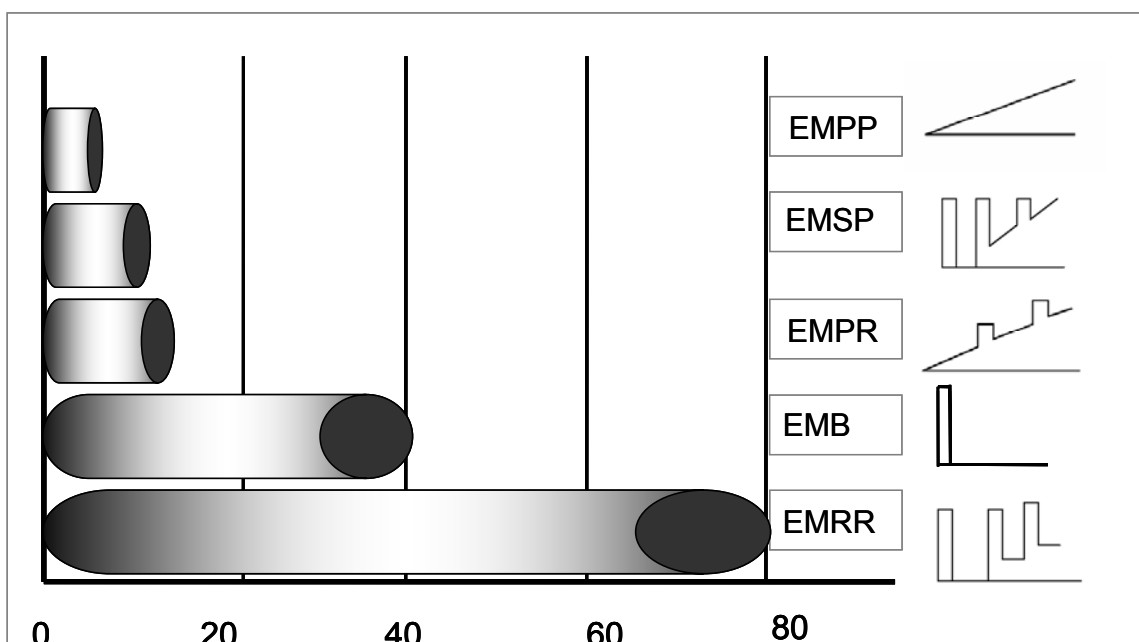
**Secundaria-Progresiva (SP):** Inicialmente es una forma remitente-recurrente seguida de progresión, con o sin recaídas. Se ha estimado que la proporción de pacientes con

EMRR que desarrollan una evolución SP es del 50% al cabo de 10 años desde el inicio de la enfermedad.

**Progresiva-Recurrente (PR):** Es una enfermedad progresiva desde su inicio, con claras recaídas con o sin recuperación completa; los períodos entre brotes se caracterizan por una continua progresión.

**Forma benigna (FB):** Es la forma de EM que permite al paciente preservar su capacidad funcional en todo el sistema neurológico, 10-15 años después de la presentación de la enfermedad. En algunos casos puede derivar a la forma SP.

**Figura 2.** Formas de presentación y evolución de la enfermedad, con las frecuencias relativas de aparición. Modificado de Medifam, vol 11, Núm 9, 516-529, Octubre/Noviembre 2001.



La enfermedad es altamente heterogénea en términos de curso clínico, apariencia de las lesiones en las imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN), histopatología de las lesiones, parámetros inmunológicos y en la respuesta a los tratamientos, lo que revela que diversos mecanismos celulares, humorales y posiblemente metabólicos subyacen a la lesión en diferentes individuos.

#### 1.4.4. Frecuencia de los brotes

La recurrencia de los brotes es variable, pero como valor promedio puede establecerse una cifra de 0,7-0,9/año en los pacientes en fase RR y de 0,30/año si se considera a



todos los pacientes, independientemente del tipo de evolución. El intervalo entre los síntomas de comienzo y el siguiente brote es muy variable. En el primer año recae un 30%; el segundo año, el 20%; entre los 5 y 9 años siguientes, el 20%; y entre los 10 y 30 años, el 10%. La recurrencia precoz se asocia con mal pronóstico.

### **1.4.5. Escalas de disfunción neurológica**

La Escala de Discapacidad Ampliada de Kurtzke (EDSS), se creó para clasificar los pacientes con EM de acuerdo con su nivel de discapacidad y para el seguimiento del curso evolutivo de la enfermedad con el tiempo. Es una escala ordinal derivada de la exploración neurológica por medio de los Sistemas Funcionales desde la puntuación de 0 a 3,5, la capacidad para la deambulación desde 4,0 a 7,5 y el grado de dependencia desde 8,0 a 9,5. La puntuación 10 corresponde al fallecimiento debido a la enfermedad. Es una escala que se utiliza ampliamente y ha sido validada en varias ocasiones. Se utiliza como medida estándar de la capacidad funcional en el campo de la EM (Kurtzke, 1983). Sin embargo, se basa principalmente en la capacidad de deambular de los pacientes y deja más al margen otros aspectos como la capacidad cognitiva, la visión, la fatiga, la calidad de vida y el control de la función esfinteriana del paciente.

## **1.5 DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

El diagnóstico clínico de la EM se realiza considerando la existencia de criterios clínicos de diseminación espacial (existencia de dos lesiones independientes en el SNC) y de diseminación temporal (dos o más episodios de disfunción neurológica). En la actualidad, el diagnóstico se realiza según las manifestaciones clínicas y los siguientes criterios paraclínicos:

- La punción lumbar, con el fin de descartar otra posible etiología y analizar la presencia de bandas oligoclonales (BO) producidas por la presencia de anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y no el suero del paciente. Los hallazgos característicos del LCR en la EM son la elevación discreta de las células y de las proteínas totales en el 40% de los pacientes; elevación del porcentaje de inmunoglobulinas (Igs) en el 70%; elevación de la inmunoglobulina G (IgG) en el 80%; índice de IgG elevado y presencia de BO en algo más del 90% (Andersson et al., 1994). La presencia de más de 50 células/ $\mu$ l y de más de 100 mg/dl de proteínas totales, y la ausencia de BO, deben hacernos sospechar de otras enfermedades.

- Los potenciales evocados miden la respuesta del SNC frente a estímulos específicos (sonoros, visuales y sensitivos). Se utilizan para la valoración de la integridad funcional de algunas vías nerviosas (visual, acústica, somatosensitiva, motora) y proporcionan una medida fiable de desmielinización.
- La RMN, técnica de gran valor diagnóstico en la actualidad para visualizar imágenes precisas y altamente detalladas del cerebro y de la médula espinal.

Es posible descartar otras enfermedades y llegar a un diagnóstico de certeza de la EM en la mayor parte de los casos. Existe un pequeño porcentaje de pacientes (1-2%) que plantean una gran dificultad diagnóstica; se trata de pacientes con un curso clínico progresivo primario, afectación única o preferentemente medular y normalidad en las exploraciones complementarias (Palace, 2001).

### 1.5.1. Criterios de Poser

**Los criterios de Poser** (Poser et al., 1983), permiten clasificar a los pacientes en cuatro grados de certeza diagnóstica (definida y probable) combinando criterios clínicos y paraclínicos utilizando pruebas de imagen, estudios de LCR, urodinámicos y neurofisiológicos. Se muestran a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos de la esclerosis múltiple, según los criterios de Poser (1983).

<b>Esclerosis múltiple definida clínicamente</b>	2 brotes y evidencia clínica de 2 lesiones separadas.	2 brotes, evidencia clínica de una lesión y paraclínicas de otra lesión separada.	
<b>Esclerosis múltiple definida apoyada por datos de laboratorio</b>	2 brotes, evidencia clínica o paraclínica de 1 lesión y alteraciones inmunológicas en el LCR.	1 brote, evidencia clínica de 2 lesiones separadas y alteraciones en el LCR.	1 ataque, evidencia clínica de una lesión y paraclínica de otra lesión separada, y alteraciones en el LCR.
<b>Esclerosis múltiple probable clínicamente</b>	2 brotes y evidencia clínica de 1 lesión.	1 brote y evidencia clínica de 2 lesiones separadas.	1 brote, evidencia clínica de 1 lesión y paraclínica de otra lesión separada.
<b>Esclerosis múltiple probable apoyada por datos de laboratorio</b>	2 brotes y alteraciones en el LCR.		

Los datos de laboratorio pueden apoyar el diagnóstico, si el examen de LCR muestra BO y aumento de producción de IgG. Deben existir al menos dos bandas en el LCR que no se observan en el suero (Willoughby and Paty, 1988). Estos datos de laboratorio no son específicos de la enfermedad, pero indican producción intratecal de inmunoglobulinas.

Los criterios diagnósticos de Poser permiten establecer un diagnóstico muy certero, aunque no temprano de la enfermedad. Ante las evidencias crecientes de la importancia del diagnóstico precoz de la EM para iniciar el tratamiento, un comité de expertos presidido por McDonald propuso unos nuevos criterios diagnósticos (McDonald et al., 2001), basados fundamentalmente en la diseminación de las lesiones en el espacio y en el tiempo, valorada mediante RMN. Las imágenes de RMN (ejemplos de pacientes en las Figuras 3.1 y 3.2) se emplean para visualizar las áreas de desmielinización en el SNC y permiten la evaluación de lesiones diseminadas en diferentes localizaciones anatómicas y en el tiempo (según los criterios de McDonald y cols.). La RMN permite demostrar lesiones desmielinizantes no sospechadas clínicamente, determinar en un solo estudio los criterios de diseminación espacial (presencia de más de una lesión) y temporal (las secuencias en T1 con gadolinio demuestran lesiones agudas, mientras que las secuencias en T2 demuestran preferentemente lesiones crónicas), así como avanzar en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad, demostrando que la actividad detectada por RMN antecede a los síntomas clínicos y que la actividad captada por RMN es de 5 a 20 veces más frecuente que los brotes clínicos (Miller et al., 1993).

Los nuevos criterios diagnósticos recomiendan abandonar las denominaciones de “EM clínicamente definida” y “EM probable” empleadas en los criterios de Poser. Los resultados de las evaluaciones diagnósticas serán: “EM”, “no EM”, o “posible EM” (aquellos pacientes que parecen presentar cierto riesgo de padecer EM, pero en los que el diagnóstico no ha sido concluyente).

### **1.5.2. Criterios de Mc Donald**

Los datos paraclínicos en los criterios de Mc Donald corresponden a los aportados por la RMN, alteraciones del LCR (BO) y estudios neurofisiológicos (PEV y PEA).

La RMN aporta evidencias positivas para el diagnóstico de EM en cuanto a la diseminación espacial de las lesiones cuando presenta al menos 3 de las siguientes 4 condiciones (denominados criterios de Barkhof):

- Una lesión realzada con gadolinio o 9 lesiones hiperintensas en secuencias T2, en el caso de no presentar ninguna lesión realzada con gadolinio.
- Una o más lesiones infratentoriales.
- Una o más lesiones yuxtacorticales.
- Tres o más lesiones periventriculares.

Para objetivar la diseminación en el tiempo mediante RMN, se realizan exploraciones seriadas, a los 3 meses y en ocasiones a los 6 meses, del brote inicial, según el momento de la exploración de RMN inicial.

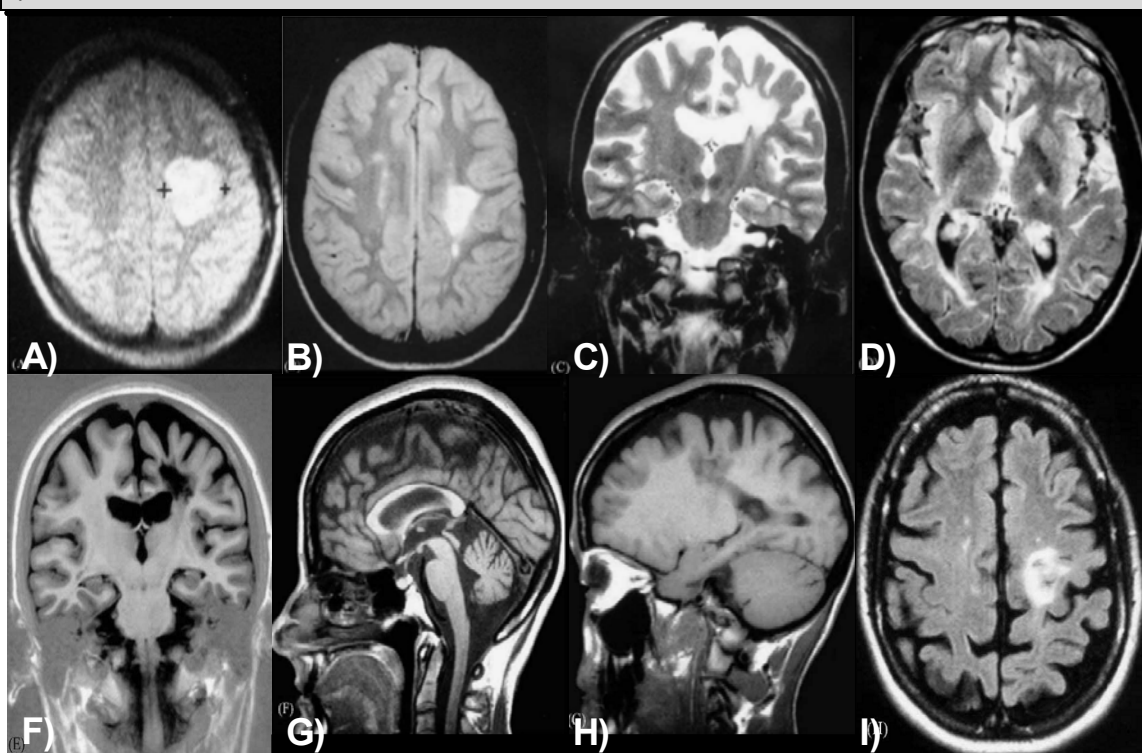
**Figura 3.1.** Resonancia magnética craneal. Se objetivan varias lesiones hipointensas en secuencias sagitales T1 (A) en la corona radiada izquierda. B) Se aprecia una lesión coronal izquierda periventricular hiperintensa en T2. C) Aparecen lesiones en la sustancia blanca en secuencias axiales T2. D) Se muestra un aumento de captación de gadolinio en la corona radiada izquierda. Imágenes amablemente cedidas por la Dra. de Andrés



En un estudio realizado en una cohorte de pacientes con síndrome clínico aislado (SCA) que sugería EM, se estudió la exactitud de la conversión a EM aplicando los criterios de Mc.Donald y comparándolos con los criterios de Poser. Sobre la base de los nuevos criterios de McDonald se establecieron dos formas de probar diseminación en espacio: Presencia de al menos 3 de los 4 criterios de Barkhof, o presencia de al menos 2 lesiones en T2, más la presencia de BO. Se definió diseminación en el tiempo a la aparición de al menos 1 nueva lesión en T2 en la RMN, que era repetida al año. Se consideró que un paciente cumplía con los criterios de RMN cuando había diseminación en tiempo y espacio. Sin embargo, los criterios de Poser requerían un segundo brote clínico para reunir los requisitos de EM clínicamente definida. La mayoría (80%) de los pacientes que cumplían los criterios de Mc Donald a los 12 meses presentó un segundo evento clínico durante el seguimiento, lo cual demuestra la utilidad de estos criterios en la predicción del diagnóstico de EM (Tintore et al., 2003). Los criterios de McDonald

sirven para el diagnóstico precoz de la EM, necesario para iniciar el tratamiento y retardar la aparición de un segundo brote.

**Figura 3.2.** Descripción de un caso clínico. Las imágenes axiales en secuencias T2 (A) y (B) muestran una lesión hiperintensa extensa (más pequeña pseudotumoral en B) en la sustancia blanca axial en el centro semioval izquierdo en lóbulo frontal realizadas en 1986 y Abril de 1999, respectivamente. En B) se observan nuevas lesiones en el centro semioval derecho y en la sustancia blanca subcortical. (C) Abril de 1999, secuencias turbo espín-eco (TSE) coronales en T2 que muestran lesiones hiperintensas delineando el curso de la degeneración walleriana a lo largo del tracto corticoespinal. (D) En 1999, secuencias espín-eco (SE) T1 sagitales demuestran atrofia focal en el cuerpo calloso. (E) Abril de 1999, secuencia inversion recovery (IR) en T1 coronal que muestra una lesión hipointensa “agujero negro” confluyente extensa periventricular en el lóbulo frontal izquierdo. (F) En secuencias T1 sagital se observa una lesión hiperintensa en la cápsula interna izquierda; y (G) patrón del curso anatómico de la degeneración walleriana y ensanchamiento del surco frontal izquierdo en relación con la lesión de la sustancia blanca en el centro semioval. (H) Marzo de 2002, secuencia axial FLAIR que muestra una lesión hiperintensa en T2 en la cápsula interna izquierda y atrofia en el lóbulo frontal izquierdo. Imágenes amablemente cedidas por la Dra. de Andrés



La RMN craneal convencional detecta lesiones en el 95%; la RMN cervical en el 75% de los pacientes con EM. Se aprecia atrofia cortico-subcortical en el 40-50% de los casos tras un período medio de 12 años. La RMN informa acerca de la histopatología: La captación de gadolinio, en las secuencias T1, representa ruptura de la barrera hemato-encefálica (BHE), que en la EM precede a los fenómenos inflamatorios. La

destrucción de la mielina y el axón puede estudiarse por medio de la tasa de transferencia de magnetización por RMN (TMR); la gliosis, mediante la secuencia T1 espín-eco. La técnica de RMN de difusión mide la integridad tisular, estudiando el edema, la desmielinización y la pérdida axonal. La disfunción o destrucción axonal puede evaluarse mediante espectroscopia por RMN (ERM), que permite detectar cambios en el N-acetilaspártato (NAA), el cual es un marcador de la actividad neuronal. En los últimos años, el empleo sistemático de la RMN ha permitido la descripción de la evolución natural de la EM. La EM es una patología muy dinámica, con lesiones independientes que se modifican a lo largo del tiempo. La ruptura de la BHE es el primer acontecimiento patogénico detectable mediante la captación de gadolinio en T1 (Filippi et al., 1996); tras el que aparecerá la lesión aguda detectada mediante la RMN de densidad protónica en T2 (Figuras 3.1 y 3.2).

Generalmente estas lesiones aumentarán de tamaño a lo largo de aproximadamente un mes, para desaparecer después gradualmente. Antes de la captación de gadolinio, aparecen cambios en la tasa de TMR de la sustancia blanca de aspecto normal de la misma localización, lo que sugiere episodios previos a la ruptura de la BHE y una actividad latente no revelada por las técnicas de RMN convencionales (Filippi et al., 1998). Por otra parte, las lesiones pueden hacerse crónicas, siendo detectadas como lesiones hiperintensas en RMN de densidad protónica en T2, o en forma de “agujeros negros” en T1 (Truyen et al., 1996; van Walderveen et al., 1998). Estos aspectos de la enfermedad pueden ser monitorizados con la medición del volumen lesional total en RMN.

## **1.6. FISIOPATOGENESIS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La EM es la enfermedad neurológica más frecuente en adultos jóvenes (Hafler, 2004), con una incidencia creciente en líneas generales en todo el mundo. Se define como una enfermedad desmielinizante crónica, caracterizada por lesiones multifocales de localización preferente en la SB del SNC. Aunque su exacta patogénesis se desconoce, la formulación actual es que componentes inflamatorios y degenerativos son eventos patogénicos interrelacionados. Se han propuesto varias hipótesis fisiopatogénicas: infecciosa/vírica, autoinmune, metabólica – degenerativa. Ninguna de estas hipótesis de forma aislada satisface el espectro clínico de la enfermedad, por lo que es posible que todos estos factores pudieran intervenir de forma diversa en el curso de la misma. Algunos autores incluso proponen que las diferentes formas clínicas representen

diferentes fenómenos patogénicos subyacentes a diferentes enfermedades. No obstante, parece claro que el sistema inmunológico desempeña un papel en la producción y en la amplificación de las lesiones acumuladas en la enfermedad.

Se acepta ampliamente que la patogenia de la EM está mediada por el sistema inmunológico, basándose en las siguientes observaciones:

- Presencia de células inflamatorias en las lesiones desmielinizantes,
- la susceptibilidad a la enfermedad está ligada a genes relevantes de la respuesta inmunológica,
- el curso de la enfermedad puede ser modificada por el tratamiento inmunomodulador y pueden producirse enfermedades inflamatorias y desmielinizantes del SNC inyectando antígenos del SNC o células T encefalitogénicas en animales susceptibles (Birbaum, 1998).

### **1.6.1. Inmunofisiopatología de la Esclerosis Múltiple**

Se desconoce todavía si los fenómenos inmunológicos se inician en la periferia o en el SNC, si son un evento primario o secundario del SNC. La teoría más ampliamente aceptada actualmente es que la fisiopatología de la EM está mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreactivos dirigidos frente a antígenos de la mielina que atraviesan la BHE procedentes de sangre periférica y que mediante complejos mecanismos inmunológicos producen desmielinización, con déficits neurológicos parcialmente reversibles (Miller and Galboiz, 2002). Estudios inmunohistoquímicos han mostrado que en las lesiones activas se produce transección axonal y que el grado de daño axonal se correlaciona con el número de macrófagos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> en las lesiones (Kuhlmann et al., 2002). Posteriormente se produce daño axonal, ya irreversible, que se manifiesta por déficits neurológicos permanentes (Noseworthy et al., 2000). Existen evidencias de una respuesta inmunológica humoral anormal en el LCR de los pacientes con EM, con activación de los linfocitos B y expansión de un grupo seleccionado de células plasmáticas, demostrada por la presencia de inmunoglobulinas sintetizadas en el SNC, que da lugar al hallazgo característico de las BO en la mayoría de los pacientes. Se distinguen por tanto, dos fases en la fisiopatología: una fase inflamatoria de desmielinización y una fase neurodegenerativa, si bien ambas pueden seguirse precozmente desde el inicio de la enfermedad.

La predisposición hereditaria, combinada con un factor ambiental desconocido, establece o mantiene linfocitos T autorreactivos, que tras un período de latencia de 10-20 años, serán activados por un factor desencadenante (infección viral o bacteriana, cambios hormonales, estrés, etc.) (Fernández, 2005). Parece que la activación de los linfocitos T autorreactivos sería el evento crítico en la inducción de la enfermedad autoinmune (Figura 4). Se ha observado una elevada expresión de moléculas coestimuladoras B7.1 (CD80) en la SB de pacientes con EM, y la mayoría de los pacientes presentan linfocitos T reactivos a cierto número de antígenos de la mielina, lo que sugiere que en el momento en que un paciente desarrolla una EM clínica se ha producido una expansión de epítomos (*"epitope spreading"*) con reactividad a múltiples epítomos de la mielina. Sin embargo, la presencia de linfocitos T con expansión oligoclonal en LCR y tejido cerebral en pacientes con EM parece indicar reactividad clonal a sólo un número determinado de antígenos de mielina. La alta frecuencia de linfocitos T activados específicos de la mielina en sangre periférica y LCR en pacientes con EM parece compatible con la hipótesis de que la enfermedad es inducida en un subgrupo de pacientes por una infección microbiana (Hafler, 2004).

El funcionamiento inmunológico normal requiere del continuo tráfico linfocitario a través del sistema circulatorio y en los diferentes órganos y tejidos linfáticos y no linfáticos, incluido el SNC. En respuesta a una agresión, diversas poblaciones leucocitarias son reclutadas del sistema circulatorio hacia el foco inflamatorio, en un proceso finamente regulado denominado extravasación, que permite la salida de forma específica, ordenada y secuencial de las células más adecuadas para enfrentarse a la agresión. Inicialmente, las citocinas proinflamatorias Th1, como la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), inducen un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión endotelial, E-selectina, molécula de adhesión intracelular ICAM-1 y la molécula de adhesión vascular VCAM-1. Las selectinas endoteliales establecen enlaces débiles con ligandos leucocitarios que hacen a los leucocitos rodar sobre la pared vascular en la dirección de la corriente sanguínea. El deslizamiento permite la activación y el cambio conformacional de las integrinas leucocitarias, antígeno asociado a la función linfocitaria LFA-1 y antígeno muy tardío VLA-4. Posteriormente, estas integrinas leucocitarias se unirán a sus respectivos ligandos endoteliales (ICAM-1 y VCAM-1) mediante enlaces estables. Entonces las células se deforman y atraviesan el endotelio. La extravasación ocurre bien a través del

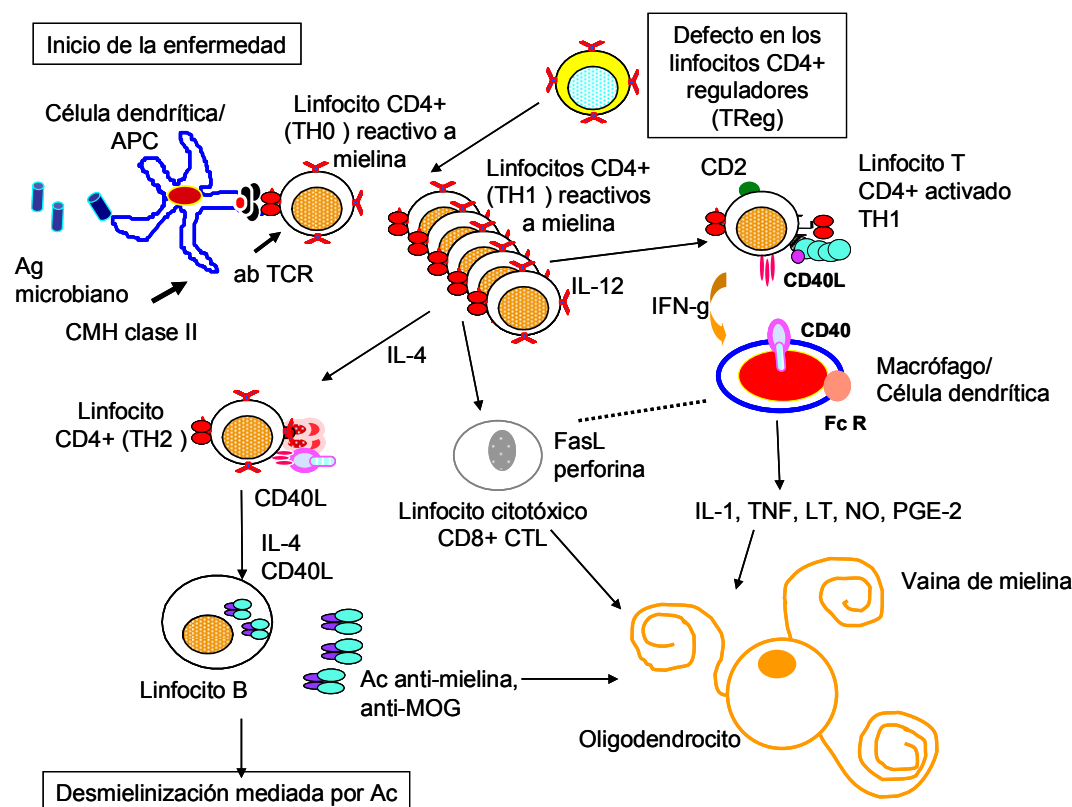


endotelio o a través de las uniones celulares y requiere la interacción de ICAM-1 y LFA-1, así como la participación de otras moléculas de adhesión y a la producción linfocitaria de proteasas que degraden la matriz extracelular (metaloproteasas de la matriz o MMP; gelatinasa A o MMP-2 y la gelatinasa B o MMP-9). En este momento desempeñan un papel importante las quimiocinas (citocinas quimioatrayentes) (Fernández, 2005).

Una vez en el SNC, el linfocito activado encontrará a una célula presentadora de antígeno (CPA) (célula dendrítica, macrófago o microglía) que expresa en su superficie el antígeno causante de la EM presentado por el CPH de clase II. Se han descrito linfocitos T autorreactivos específicos de proteína básica de la mielina (PBM) en el LCR y, ocasionalmente, en las lesiones de EM. El haplotipo DR2 puede influenciar la respuesta autoinmune porque se une con alta afinidad a un fragmento de la PBM (de los aminoácidos 85 a 99), estimulando las respuestas T efectoras a esta proteína propia. Mientras que el receptor clonotípico del linfocito T (TCR) parece ser altamente específico en el reconocimiento de este péptido, utilizando química combinatoria se ha demostrado que al alterar el ligando del péptido se puede cambiar la conformación del TCR para dar lugar a un alto grado de reactividad cruzada, y se han identificado gran número de epítomos virales que podrían desencadenar clones de linfocitos T autorreactivos. De hecho, se identificó un clon específico para la PBM. Por tanto, existe un grado importante de degeneración funcional en el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T. Estos datos son compatibles con la hipótesis de que la actividad de la EM podría ocasionalmente ser desencadenada por linfocitos T autorreactivos activados por antígenos microbianos que hacen reactividad cruzada (mimetismo molecular) con la mielina (Hafler, 2004). Los antígenos de la mielina del SNC implicados en la autorreactividad (autoantígenos) de los linfocitos T incluyen la PBM, la glucoproteína mielínica del oligodendrocito (GMO), glucoproteína asociada a la mielina (GAM), proteína proteolípido (PLP),  $\alpha$ B-cristalina, transaldolasa, fosfodiesterasas y otras proteínas no mielínicas, como las proteínas de choque térmico, antígenos astrocitarios (proteína S100), algunos antígenos endoteliales y factores nucleares (Fernández, 2005). La teoría de superantígenos microbianos, sostiene que ciertos péptidos microbianos, los superantígenos, tendrían una capacidad única de estimular de forma fulminante a gran número de linfocitos, incluidos linfocitos autorreactivos.

La desmielinización, en último término, podría ser el resultado de la acción combinada de fenómenos inmunológicos; linfocitos T autoreactivos y autoanticuerpos contra antígenos específicos del SNC, y de factores citotóxicos; glutamato, radicales libres, los cuales podrían actuar sinérgica o secuencialmente.

**Figura 4.** Inmunofisiopatología de la esclerosis múltiple. Tomado de la revisión de Confinia neurologica, 2007 (en prensa). De Andrés, C and Sánchez-Ramón, S.



Entre los **mecanismos celulares** destaca el ataque inmunológico directo a los oligodendrocitos por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y por los linfocitos T<sup>γδ</sup>+, que no tienen restricción CPH y que están presentes en las lesiones, en especial en los lugares de lesión del axón. Además los oligodendrocitos podrían resultar dañados como espectadores inocentes en la reacción inflamatoria en que los linfocitos T activados producen TNFβ (linfotóxina), que induce la apoptosis de los oligodendrocitos, y por la acción de las perforinas, que dan lugar a un aumento del calcio intracelular y a la formación de poros en los oligodendrocitos y su muerte. Los macrófagos estimulados también producen sustancias potencialmente tóxicas, como las proteinquinasas, los radicales libres, óxido nítrico y TNFα, que podrían desempeñar un papel en la

desmielinización. La autoanticuerpos inducen la activación del complemento, que pone en marcha el complejo de ataque a la membrana y atrae a macrófagos, que liberan sustancias tóxicas, produciendo desmielinización.

## 1.7. CÉLULAS DENDRÍTICAS

### 1.7.1. Implicación de las células dendríticas en la Esclerosis Múltiple

Más concretamente, en la EM, existen indicios que señalan a las células dendríticas (CDs) como responsables de la activación de los clones T autorreactivos y, por tanto, principales responsables del inicio de la enfermedad. Las CDs desempeñan un papel fundamental en la inducción y regulación de las respuestas de los linfocitos T, son las más potentes CPA y las únicas CPA capaces de inducir respuestas inmunológicas primarias, es decir, de activar linfocitos T vírgenes (Banchereau and Steinman, 1998). La singularidad de las CDs radica, entre otros factores, en su gran capacidad de reconocimiento y captura de antígenos cuando son inmaduras, de su capacidad migratoria estrechamente regulada y de su elevada expresión de moléculas del CPH y coestimuladoras, así como en su capacidad de secretar citocinas polarizadoras una vez alcanzada su madurez funcional. Todo ello posibilita una interacción entre el CPH de la CD y el TCR en un entorno molecular adecuado, lo que conlleva una eficiente activación y polarización de linfocitos T vírgenes. En humanos, pueden aislarse en sangre periférica dos subpoblaciones principales de CDs: las CDs mieloides (en inglés, “myeloid dendritic cells”; mCDs) y las CDs plasmacitoides (en inglés, “plasmacytoid dendritic cells”; pCDs). Ambas poblaciones carecen de marcadores específicos de otros linajes (lin-), muestran distinto fenotipo, vías de desarrollo, distribución tisular y función diferentes. Las mCDs ( $CD11c^{+}CD123^{-}$ ), son excelentes CPA, que producen grandes cantidades de IL-12 p70 y generan potentes respuestas T colaboradoras (“*T helper*”; Th) de tipo 1 (Th1) y CTL. Las pCDs ( $CD11c^{-}CD123^{+}$ ; receptor  $\alpha$  para la IL-3; IL-3R) son las principales células productoras de interferón de tipo I ante la infección de bacterias y de virus encapsulados, e inducen respuestas Th2 y tolerogénicas en respuesta a las moléculas CD40 o IL-3, si bien también se ha descrito que tras su activación por virus o CD40 pueden generar respuestas Th1 (Fuchsberger et al., 2005; Zhang and Wang, 2005). Sin embargo, analizando la expresión de otros marcadores como CD1c, CD16, BDCA-3 o CD34, estas dos subpoblaciones se pueden subclasificar hasta llegar a 5 subtipos distintos (MacDonald et al., 2002).

### **1.7.2. Estadíos madurativos de las células dendríticas. Regulación de la migración**

Recientemente se han identificado toda una serie de moléculas que permiten una identificación fenotípica más precisa de cada uno de los subtipos de CDs descritos. Así, las pCDs expresan de manera específica y constitutivamente la lectina de tipo II C, BDCA-2 (“Blood Dendritic Cell Antigen”), que podría desempeñar un papel en la internalización y presentación de ligandos. Las CDs inmaduras están distribuidas en localizaciones de potencial invasión antigénica y en sangre periférica y reconocen antígenos a través de su repertorio de receptores: receptores de reconocimiento de patrones (PAR), que se unen a estructuras moleculares conservadas compartidas por un gran número de microorganismos (receptores tipo toll o “Toll-Like Receptors”; TLR, receptores de manosa); y receptores de opsoninas endógenas (receptores Fc, receptores del complemento, CD36). Tanto la inflamación como la necrosis tisular inducen la maduración de las CDs. Las CDs maduras expresan en su superficie moléculas del CPH y coestimuladoras, lo que permite la eficiente presentación de antígenos previamente capturados. Las mCDs poseen un ciclo vital característico, según el cual sus funciones de captura y presentación del antígeno tienen lugar en distintas localizaciones y de manera secuencial. Cuando maduran, migran desde las lesiones inflamatorias hasta las zonas T de los órganos linfoides secundarios, donde emiten sus pseudópodos. Allí interactúan con los linfocitos T cooperadores, mediante dos señales de activación que constituyen lo que se denomina la “sinapsis inmunológica”: Una señal antígeno-específica, interacción péptido-CPH:TCR/CD3 (señal 1); y una señal coestimuladora necesaria para la activación y la proliferación del linfocito T, B7: CD28 (señal 2). CD28 es la principal molécula coestimuladora, que además de cooperar en la señalización a través del TCR, activa una vía de activación distinta que lleva al transporte de moléculas de la superficie celular al lugar de sinapsis, influye directamente en la transcripción nuclear y bloquea la salida del NF-AT del núcleo, incrementando así el efecto de esta familia de factores de transcripción. Existen datos de que además es necesaria una tercera señal de las CDs maduras al linfocito Th, que inducirá una polarización hacia Th1 o Th2, mediante la producción y liberación de citocinas (señal 3). A su vez, las CDs estimulan linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes (presentación cruzada) y a las células LGL/NK. También contribuyen a la activación de los linfocitos B y se cree que son responsables de la memoria del linfocito T a largo plazo (Ludewig et al., 2004).

La migración de las CD se basa en un complejo programa con cambios drásticos en la expresión y función de receptores de quimiocinas (Bendriss-Vermare et al., 2001). Las distintas subpoblaciones de CD migran a través del endotelio de manera diferente, tanto de forma espontánea como en respuesta a determinados estímulos quimiotácticos (de la Rosa et al., 2003). En general, se acepta que las CD inmaduras expresan CXCR1, CCR1, CCR2, CXCR4, CCR5 y CCR6, lo que les permite migrar hacia los focos inflamatorios en respuesta a RANTES, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y MIP-5. Por el contrario, una vez expuestas a estímulos de inflamación/maduración, las CD regulan negativamente la expresión y la función de receptores de quimiocinas proinflamatorias y adquieren CCR7, que les permite migrar hacia los ganglios linfáticos en respuesta a MIP-3 $\beta$  y SLC/6Ckine. Ambos ligandos del CCR7 se producen en los órganos linfoides secundarios y favorecen la migración de las CD hacia las zonas T de los ganglios linfáticos.

### **1.7.3. Presencia de células dendríticas en el sistema nervioso central**

Hasta hace unos años se pensaba que no existían CD en el SNC. Datos recientes en modelos animales demuestran la presencia de CD en meninges y plexos coroideos, así como en el parénquima cerebral inflamado. También se ha demostrado la migración de CD desde el SNC hasta los ganglios cervicales profundos. Nuestro grupo y otros autores han demostrado la presencia de CD, mieloides y plasmacitoides, en el LCR de pacientes en brote de EM, encontrando además un claro incremento del número de CD en sangre periférica con respecto a controles sanos (De Andrés et al., 2000) (Pashchenkov et al., 2003; Pashenkov et al., 2003). Los pacientes que presentaron como primera manifestación de la enfermedad neuritis óptica (n=6), mostraron mayor número de CD en LCR que cuando el brote aparece en pacientes con más larga evolución, lo que sugiere que las CD podrían desempeñar un papel relevante en la fisiopatología al inicio de la enfermedad.

### **1.7.4. Implicación de las células dendríticas en enfermedades autoinmunes**

Las CD se han relacionado con la inducción de enfermedades autoinmunes. Los parámetros críticos por los que una respuesta autoinmune puede dar lugar a una enfermedad autoinmune son la cantidad de autoantígeno presentada por las CD (magnitud que se ve favorecida por las infecciones virales recurrentes o persistentes) y la duración de la presentación antigénica en los órganos linfoides secundarios. Por el

contrario, se ha propuesto recientemente que las CD desempeñan un papel fundamental en establecer la tolerancia periférica, alterando el funcionamiento de los linfocitos T producidos en el timo. Por consiguiente, las CD tendrían la doble función de inducir respuestas autorreactivas y de silenciar los linfocitos T autorreactivos *in vivo* (Steinman, 2003; Steinman et al., 2003). Las limitaciones de la tolerancia central (falta de acceso de muchos autoantígenos al timo, autoantígenos que se expresan tardíamente cuando ya se ha establecido el repertorio linfocitario, la constante exposición de antígenos ambientales inocuos o no-patogénicos y por último, la reactividad cruzada de receptores linfocitarios para antígenos extraños con autoantígenos) necesitan de eficaces mecanismos periféricos de control.

### **1.7.5. Las células dendríticas como inductoras de tolerancia**

La capacidad de inducir tolerancia depende del estado de maduración funcional de las CD. Los tres principales mecanismos por los que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> maduros adquieren la capacidad de tolerancia frente a autoantígenos son la anergia funcional, la muerte celular por apoptosis y la supresión mediada por citocinas. Durante la activación, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresan la molécula CTLA-4, que se une a la molécula B7 de la CD, y genera señales que inhiben la producción de IL-2 y la progresión del ciclo celular del linfocito T. CTLA-4 ha demostrado desempeñar un papel fundamental en la inducción de anergia. Por otra parte, la expresión de Fas es esencial para la apoptosis inducida por estimulación repetida con autoantígenos (Van Parijs and Abbas, 1998). De hecho, mutaciones en los genes que codifican CTLA-4 o Fas se asocian con la aparición de enfermedad autoinmune. Las CD inducen tolerancia por presentación del autoantígeno sin coestimulación, es decir, en ausencia de la señal 2 de la sinapsis inmunológica.

## **1.8. LINFOCITOS T REGULADORES**

### **1.8.1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores**

Una de las subpoblaciones más importantes de células reguladoras consiste en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturales, “natural T<sub>Reg</sub>” (nT<sub>Reg</sub>), que derivan de una población madurada funcionalmente en el timo. Alteraciones deletéreas en esta subpoblación reguladora, provocan la aparición de enfermedades autoinmunes en ratones, muchas de las cuales son reflejo de las correspondientes enfermedades en humanos (Sakaguchi et al., 2001). El mecanismo exacto por el cual los nT<sub>Reg</sub> ejercen la supresión se desconoce aún, aunque se piensa que requiere contacto célula-célula y algunos estudios indican la

implicación de células reguladoras condicionalmente inducidas. La actividad reguladora puede ser inducida en los linfocitos T vírgenes por numerosos factores ambientales y los ejemplos más comunes de estas células reguladoras inducidas, o iTregs, son las células  $CD4^+$  Tr1 y Th3. Al contrario que los linfocitos T reguladores  $CD4^+CD25^+$  derivados del timo, la mayoría de los iTreg median la supresión principalmente por medio de la secreción de citocinas (Berthelot and Maugars, 2004).

Los nTreg representan aproximadamente un 5–10% de los linfocitos T  $CD4^+$  de sangre periférica en humanos y ratones, y se definieron por primera vez en 1995 por Sakaguchi y *col.*, los cuales mostraron que la transferencia pasiva de linfocitos T que carecían de la subpoblación  $CD4^+CD25^+$  en ratones atímicos desembocaba en el desarrollo espontáneo de varias enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T (Fehervari and Sakaguchi, 2004a). Desde su descubrimiento, se han realizado numerosos estudios para poder definir exactamente su fenotipo, desarrollo, mecanismos supresores y enfermedades que implican a los nTreg y otras células reguladoras.

### 1.8.2. Fenotipo de los linfocitos T $CD4^+CD25^+$ naturales (nTreg)

En una primera aproximación, los nTreg son similares a los linfocitos T de memoria y su repertorio TCR es tan diverso como el de cualquier otro linfocito T (Berthelot and Maugars, 2004). Sin embargo, los nTreg son anérgicos *in vitro* en presencia de estímulos convencionales de linfocitos T como el anti-CD3 soluble o unido a placa. Esta anergia puede contrarrestarse por medio de la adición de suficiente estímulo, como pueden ser las citocinas IL-2 e IL-15, las cuales también anulan las propiedades supresoras de los nTreg (Koenen et al., 2003; Fehervari and Sakaguchi, 2004a). Sin embargo, *in vivo* los nTreg sufren una expansión clonal tras exposición a antígenos, manteniendo no obstante sus propiedades supresoras (Hori and Sakaguchi, 2004). A nivel morfológico, un estudio reciente reveló que los nTreg  $CD4^{\text{low}}$  activadas con anti-CD3, anti-CD46 e IL-2 muestran un aumento en la granularidad y expresan granzima A, mientras que mantienen una cromatina nuclear condensada (Grossman et al., 2004). Se han realizado diversos esfuerzos para identificar marcadores específicos de superficie expresados por los nTreg, pero no se ha encontrado un marcador definitivo. El marcador más ampliamente reconocido y empleado para los nTreg es la cadena alfa del receptor de la IL-2, (CD25) (Sakaguchi et al., 2001). A diferencia de los linfocitos T convencionales, el CD25 se expresa constitutivamente en una densidad media mayor en los nTreg en reposo. Otros receptores de superficie celular incluyen el receptor del factor de de

necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR), CTLA-4 (CD152), galectina-1, CD38, CD62L, OX-40L, CD103, TNFR2, y TGF- $\beta$ R1. Los nT<sub>Reg</sub> también expresan elevados niveles de CD5, L-selectina y CD45RO, mientras que expresan bajos niveles de CD45RC (Sakaguchi et al., 2001; Piccirillo and Thornton, 2004; Mills, 2004). Un estudio reciente, nombra la neuropilina-1, receptor involucrado en la conducción del axón, la angiogénesis y la activación de las células T, como marcador específico de los nT<sub>Reg</sub>. Todos los marcadores citados se expresan en las células T activadas convencionales, con la excepción del CD103 y la neuropilina-1 (Fehervari and Sakaguchi, 2004a; Grossman et al., 2004; Piccirillo and Thornton, 2004; Bruder et al., 2004). Dos nuevos marcadores funcionales de los nT<sub>Reg</sub> son el factor de transcripción nuclear Foxp3 y el gen 3 de activación linfocitaria (LAG-3). En ratones, Foxp3 se expresa casi exclusivamente en los nT<sub>Reg</sub> intracelularmente, mientras que en humanos, su expresión también se detecta en los linfocitos T reguladores generados extratímicamente (Fehervari and Sakaguchi, 2004a). Por otra parte, el LAG-3 se expresa en la superficie de los nT<sub>Reg</sub> y en los linfocitos T reguladores generados extratímicamente en modelos murinos (Huang et al., 2004). Tanto el Foxp3 como el LAG-3 son cruciales para la función de los linfocitos T reguladores.

### **1.8.3. Desarrollo celular de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturales (nT<sub>Reg</sub>)**

Casi todos los nT<sub>Reg</sub> se producen en un estado maduro en el timo (Sakaguchi et al., 2001). Estudios en ratones *knockout* demuestran que el CD28, CD40 y la IL-2 son esenciales para el desarrollo y la supervivencia de los nT<sub>Reg</sub> (Piccirillo and Thornton, 2004). Aunque estas moléculas son importantes para el desarrollo de los nT<sub>Reg</sub>, Foxp3 es probablemente la molécula más importante para la generación, así como para la función de los nT<sub>Reg</sub>. El bloqueo del equivalente a Foxp3 en los ratones, resulta en una enfermedad autoinmune multiorgánica así como en una linfoproliferación incontrolada debida a la ausencia de nT<sub>Reg</sub> (Fehervari and Sakaguchi, 2004a). Como se ha mencionado previamente, el gen Foxp3 se expresa casi exclusivamente en los nT<sub>Reg</sub> en ratones, sin embargo, la expresión en humanos está menos restringida. Estudios recientes revelan que Foxp3, tanto en humanos como en ratones, es un regulador negativo de la activación de los linfocitos T, probablemente a través de supresión de citocinas como la IL-2 (Hori and Sakaguchi, 2004). Un estudio reciente demostró que las células T convencionales con expresión de Foxp3 inducida por vectores retrovirales



mostraban marcadores y funciones supresoras como los nT<sub>Reg</sub> (Hori and Sakaguchi, 2004).

#### **1.8.4. Mecanismo supresor de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturales (nT<sub>Reg</sub>)**

El mecanismo molecular exacto por el que los nT<sub>Reg</sub> inducen supresión aún no está claro. Las células diana de los nT<sub>Reg</sub> incluyen células del sistema inmunológico tanto innato como adaptativo (Fehervari and Sakaguchi, 2004a). El cultivo mixto linfocitario entre linfocitos T reguladores y sus células diana demuestran que los T<sub>Reg</sub> son capaces de suprimir la proliferación y la producción de citocinas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> convencionales. Otros estudios demuestran a las células inmunes innatas, como las CDs y los monocitos, como dianas de la supresión de los nT<sub>Reg</sub> (Mills, 2004). Una vez estimulados, la función de los nT<sub>Reg</sub> es independiente de la especificidad antigénica de las células diana. Para alcanzar la función supresora de los nT<sub>Reg</sub>, es necesaria la estimulación del TCR y la presencia de IL-2 (Piccirillo and Thornton, 2004).

Hay abundantes evidencias que indican que la supresión por los nT<sub>Reg</sub> requiere contacto directo célula-célula sin la necesidad de citocinas, ya que los sobrenadantes de los nT<sub>Reg</sub> activados no poseen propiedades supresoras detectables (Fehervari and Sakaguchi, 2004a). Una serie de datos sugiere que el TGF- $\beta$  en los nT<sub>Reg</sub> puede ejercer su efecto regulador mediante su expresión en la superficie celular y no necesariamente actuando como un factor soluble. Otra forma por la cual se ha visto que los nT<sub>Reg</sub> ejercen su función reguladora es por medio de mecanismos célula-célula que incluyen las funciones citotóxicas efectoras asociadas con la síntesis de perforina, CD18 y granzima A. de forma independiente de Fas. Las dianas de los efectos citotóxicos incluyen a linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, monocitos, células B presentadoras de antígeno, y CDs (Cosmi et al., 2003; Grossman et al., 2004). Se ha demostrado un papel para LAG-3 en la supresión célula-célula mediada por los nT<sub>Reg</sub> (Huang et al., 2004). LAG-3 es una molécula relacionada con CD4 que se une al CPH de clase II, y se expresa selectivamente en los nT<sub>Reg</sub>, así como en los iT<sub>Reg</sub>. Los linfocitos T convencionales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> no expresan niveles significativos de LAG-3 al activarse. La adición del anticuerpo anti-LAG-3 produjo la inhibición de la función supresora de estas células *in vitro* e *in vivo*. El papel de LAG-3 se descubrió posteriormente por la observación de que la transducción de LAG-3 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> los volvía anérgicos e inducía en ellos la función supresora de los nT<sub>Reg</sub>, vía contacto célula-célula. También

los ratones deficientes en LAG-3 poseen el doble de linfocitos T que los ratones “salvajes” (“wild type”). Estos datos sugieren claramente un papel crucial del LAG-3 en la supresión mediada por los  $nT_{Reg}$ . Otro estudio realizado por Paust *y col*, demostró que la supresión de los linfocitos T ejercida por los  $nT_{Reg}$  podría implicar la unión a la molécula B7 en los linfocitos T diana, lo cual generaría una señal negativa. Las células diana deficientes en moléculas B7 (CD80 y en menor grado CD86) fueron resistentes a la supresión por los  $T_{Reg}$  (Fehervari and Sakaguchi, 2004a).

Un mecanismo alternativo de la supresión mediada por los  $nT_{Reg}$  es por medio de la modulación a la baja de moléculas coestimuladoras en las CPA, volviéndolas tolerogénicas (Fehervari and Sakaguchi, 2004a).

Es probable que los  $nT_{Reg}$  supriman las respuestas inmunológicas en múltiples pasos, los cuales pueden incluir señales negativas producidas por las moléculas de superficie de los  $nT_{Reg}$ , muerte por citotoxicidad, modulación a la baja de la función de las CPA, inducción de otras células reguladoras, así como otra serie de interacciones célula-célula.

Se ha documentado en ratones que numerosas enfermedades son secundarias a la pérdida de linfocitos T reguladores  $CD4^+CD25^+$ . Sin embargo, los estudios que implican linfocitos T reguladores en enfermedades humanas son menos abundantes. La mayoría de estudios realizados acerca de enfermedades humanas que analizan el papel de los linfocitos T reguladores, emplean técnicas que reportan frecuencias más bajas o un defecto en la función supresora de estas células en los pacientes.

### **1.8.5. Implicación de los linfocitos T reguladores en la fisiopatología de la Esclerosis Múltiple**

Se ha demostrado que los  $T_{Reg}$  de pacientes con EM presentan un defecto en su capacidad supresora (Viglietta et al., 2004), siendo este defecto clave en la fisiopatología de la EM. Estudios de la función supresora de los  $T_{Reg}$  mostraron que mientras las células  $CD4^+CD25^{+high}$  de controles sanos indujeron un 80% de inhibición en la proliferación de las células T  $CD4^+CD25^-$ ; un cocultivo similar con células  $CD4^+CD25^{+high}$  de pacientes con EM indujo únicamente un 20% de inhibición en la proliferación (Lan et al., 2005). También se han descrito diferencias en la capacidad supresora de los linfocitos T reguladores  $CD4^+CD25^+$  en los pacientes con EM en la producción de citocinas Th1. Por lo tanto, mientras que la producción de la citoquina Th1 IFN- $\gamma$  por los linfocitos T efectoras fue suprimida por los  $T_{Reg}$  de los controles, esa

función no fue detectable en los  $T_{Reg}$  de los pacientes con EM. Otro dato de la función defectuosa de los  $T_{Reg}$  se demostró por una menor eficiencia en la clonación, inducida por la IL-2, de los  $T_{Reg}$  de los pacientes con EM al compararla con la de los controles sanos. Estos resultados indican claramente diferencias significativas en la función de los  $T_{Reg}$  de los pacientes con EM, que contribuye potencialmente en la fisiopatogenia de la enfermedad.

### **1.8.6. Linfocitos T $CD4^+$ reguladores inducidos ( $iT_{Reg}$ )**

Se han hecho numerosos esfuerzos para identificar el resto de linfocitos T  $CD4^+$  que ejercen función reguladora únicamente tras inducción y en el contexto de moléculas particulares en el microambiente celular, como las citocinas (Fehervari and Sakaguchi, 2004b). Los linfocitos T reguladores Th3 y Tr1 son dos subpoblaciones comunes de  $iT_{Reg}$ . Otros  $iT_{Reg}$   $CD4^+$  incluyen a los  $CD4^+CD25^+$  así como a los  $iT_{Reg}$   $CD4^+CD25^-$ .

#### **1.8.6.1. Linfocitos T reguladores inducidos productores de IL-10 (Tr1)**

La producción de IL-10 es una característica distinguible de los Tr1. Los Tr1 específicos para una gran variedad de antígenos, incluidos los antígenos propios, se pueden localizar en la mucosa intestinal (Cottrez and Groux, 2004; Roncarolo et al., 2001a). Esta inducción *in vivo* puede ser debida al estímulo por CPA especializadas como las CDs (Roncarolo et al., 2001a; Levings et al., 2005). Los Tr1 productores de IL-10 pueden ser inducidos *in vitro* por medio de la diferenciación de los linfocitos T  $CD4^+$  en reposo o vírgenes en presencia de IL-10 (con estímulo sinérgico por  $IFN\alpha$ , estimulación repetitiva con CDs inmaduras, activación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD46, o por  $nT_{Reg}$  que expresan la integrina  $\alpha 4\beta 7$ ) (Stassen et al., 2004). Fenotípicamente, los Tr1 se parecen a los  $nT_{Reg}$  en que ambos son anérgicos *in vitro* y expresan CTLA-4 (Roncarolo et al., 2001a). Al contrario que los  $nT_{Reg}$ , los Tr1 no expresan elevados niveles de CD25 o Foxp3 y no realizan la supresión por contacto celular (Berthelot and Maugars, 2004). Sin embargo, un estudio demostró que los Tr1 inducidos por anti-CD3/CD46 presentan función citotóxica, induciendo apoptosis en las células diana por medio de granzima B y perforina, de forma dependiente de CD18 (Grossman et al., 2004). El perfil de citocinas de los Tr1 incluye niveles más altos de IL-10 y más bajos de TGF- $\beta$  e  $IFN-\gamma$  (Levings et al., 2005). La IL-10 y el TGF- $\beta$  son fundamentales para la supresión mediada por los Tr1 en la proliferación y liberación de citocinas por los linfocitos T vírgenes  $CD4^+CD25^-$  y linfocitos Th1 y Th2 (Mills, 2004; Roncarolo et al., 2001a; Stassen et al., 2004). Algunos estudios, han revelado que

los Tr1 humanos suprimen la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B y modulan la capacidad presentadora de antígenos de los monocitos y las CDs (Roncarolo et al., 2001a).

#### **1.8.6.2. Linfocitos T reguladores inducidos Th3**

Los iT<sub>Reg</sub> Th3, caracterizados por la producción de TGF- $\beta$ , surgen primariamente tras la ingestión de antígenos extraños por vía oral. La presencia de TGF- $\beta$ , que se encuentra en niveles elevados en el intestino, ayuda a inducir la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos Th3 (Berthelot and Maugars, 2004). La IL-10, con la consiguiente inhibición de la IL-12, pueden también aumentar la expansión de los Th3 al impedir el desarrollo y la maduración de las células Th1, las cuales pueden inhibir la expansión de los Th3 (Weiner, 2001a). La presencia de las CDs con un estado de activación diferente del que promueve la diferenciación a Th1 o Th2 también está implicada en la generación de los Th3 (Mills, 2004). Un estudio reciente documentó la inducción de la función reguladora Th3 en linfocitos T vírgenes por nT<sub>Reg</sub> que expresan la integrina  $\alpha 4\beta 1$  (Weiner, 2001b). Al igual que los nT<sub>Reg</sub>, las células Th3 expresan CTLA-4 en su superficie, lo cual resulta en la secreción de TGF- $\beta$ . La expresión de Foxp3 y CD25 también se ve aumentada tras re-estimulación de las células Th3 inducidas por TGF- $\beta$ . A diferencia de los nT<sub>Reg</sub>, el mecanismo supresor principal de los Th3 es dependiente de la producción de TGF- $\beta$ , que suprime la proliferación de las células Th1 y Th2. Los Th3 también estimulan la secreción de IgA en células plasmáticas (Weiner, 2001a; Zheng et al., 2002). La Tabla 3 resume las diferencias principales entre las células Th1, Th2, Th3, Tr1 y los linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

**Tabla 3:** Características de linfocitos T convencionales y reguladores. Diferencias en la producción de citocinas, inmunofenotipo, factores funcionales y de desarrollo de los Th1, Th2, nT<sub>Reg</sub>, Tr1 y Th3. Modificada de Autoimmun Rev 4, 351-363, 2005.

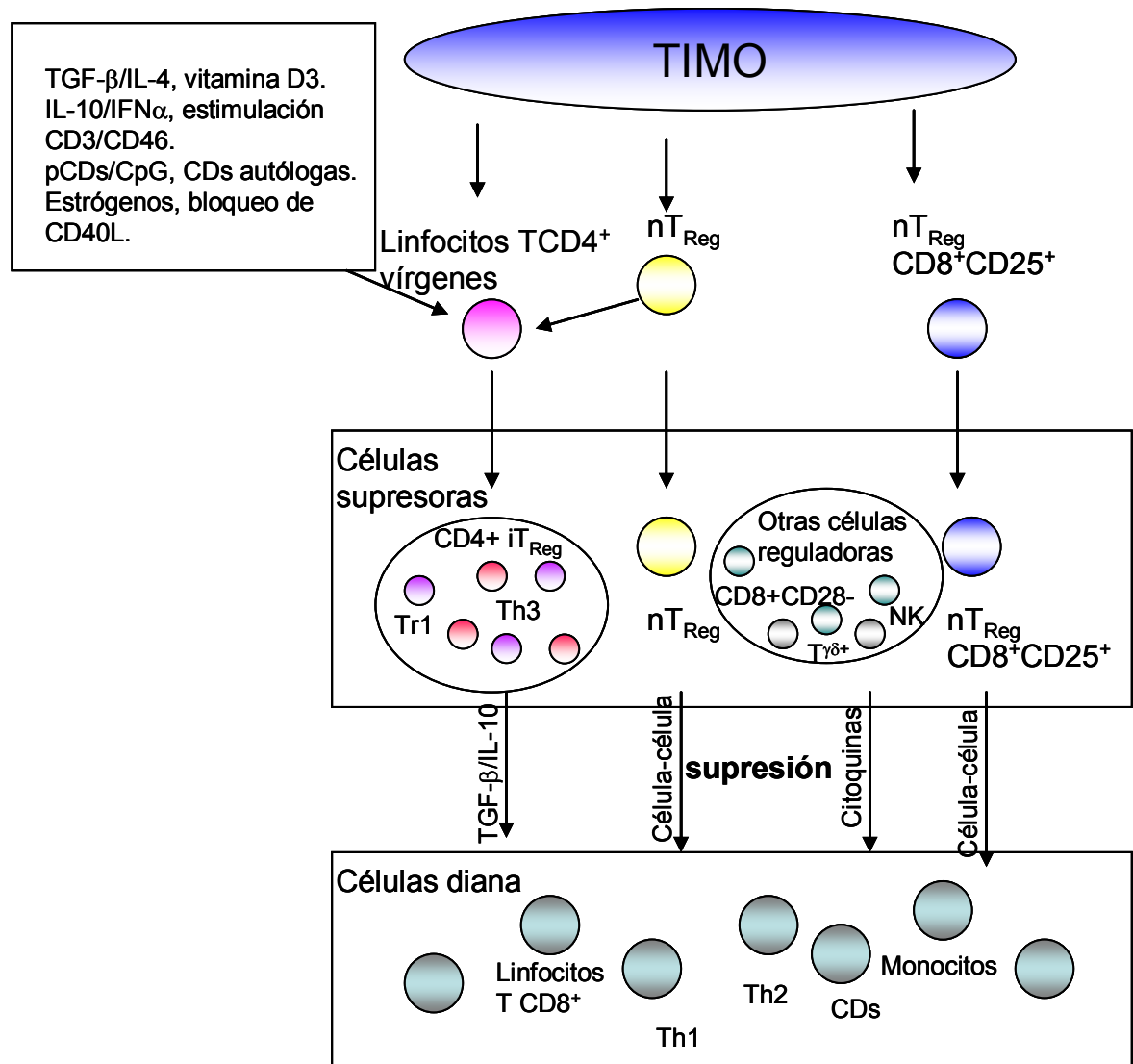
Fenotipo	Th1	Th2	nT <sub>Reg</sub>	Tr1	Th3
Respuesta proliferativa aCD3	++++	++++	- (salvo en presencia de IL2,IL-15)	- (salvo en presencia de IL-15)	?
Producción de IFN- $\gamma$	++++	-	+/-	+	+/-
Producción de IL-4	-	++++	+/-	-	+/-
Expresión de IL-2R $\alpha$	-	-	++++	+/-	+++
Expresión de IL2 $\beta$ y $\gamma\epsilon$	-	-	++++	++++	?
Expresión de Foxp3	-	-	++++	-	+++
Expresión de LAG-3	-	-	++++	?	?
Producción de IL-10	-	++	+/-	++++	+/-
Producción de TGF- $\beta$	+/-	+/-	+/-	++	++++
<b>Reconocimiento de autoantígenos</b>	+/-	+/-	++++	+?	+
Actividad cooperadora B	IgG2a	IgG1/IgE	-	-	IgA
Supresión mediada por IL-10	NA	NA	No	Sí	?
Supresión mediada por TGF- $\beta$	NA	NA	No	Sí	Sí
Supresión mediada por CTLA-4	NA	NA	No	?	Sí
Factores de crecimiento y diferenciación	IL-2	IL-2/IL-4	Interacciones tímicas, CD28. IL-2, Foxp3	IL-10/IFN- $\alpha$ (CD3/CD46, inducción por CDs y por nT <sub>Reg</sub> <sup><math>\alpha 4\beta 7^+</math></sup> )	TGF- $\beta$ /IL-4 (IL-10, $\alpha$ IL-12, inducción por CDs y por nT <sub>Reg</sub> <sup><math>\alpha 4\beta 1^+</math></sup> )

NA= No aplicable.

### 1.8.7. Otras células reguladoras

Además de los linfocitos T reguladores Tr1 y Th3, estudios recientes han demostrado numerosas formas de generar linfocitos T reguladores. Por ejemplo, el estímulo de linfocitos T vírgenes por las pCDs en presencia de secuencias repetitivas de CpG (secuencias 5'-purina-purina-CG-pirimidina-pirimidina-3' sin metilar, con capacidad de activar células dendríticas y linfocitos B) (Krieg et al., 1995) o por CDs autólogas maduras, inducen la transformación de los linfocitos T vírgenes en linfocitos T<sub>Reg</sub> citocina-dependientes que son anérgicos *in vitro* y expresan CTLA-4, CD25 y Foxp3 (Weiner, 2001a; Park et al., 2004; Verhasselt et al., 2004; Moseman et al., 2004). El estímulo de los linfocitos T vírgenes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> con estrógenos, vitamina D3, o poblaciones de CDs inmaduras también inducen la generación de iT<sub>Reg</sub> (Piccirillo and Thornton, 2004; Polanczyk et al., 2004). Hay estudios recientes en modelo murino que demuestran que los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> con TCR transgénicos específicos para un antígeno huésped, cuando se transfirieron en el huésped pueden derivar en T<sub>Reg</sub> que expresan LAG-3. Estos T<sub>Reg</sub> LAG-3<sup>+</sup> son anérgicas y expresan bajos niveles de GITR, Foxp3, y CTLA-4 (Huang et al., 2004). Aparte de los nT<sub>Reg</sub> e iT<sub>Reg</sub>, otras células también desempeñan funciones importantes en la inmunoregulación. Algunos ejemplos de estas células reguladoras, incluyen los linfocitos NK (“natural killer”) secretores de IL-10 y TGF-β, los linfocitos T reguladores CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, los linfocitos CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> derivados del timo, algunos linfocitos T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, linfocitos T con actividad antiidiotipo, linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> senescentes, así como algunas subpoblaciones de CDs (Berthelot and Maugars, 2004; Mills, 2004; Manavalan et al., 2004; Sonoda et al., 2001). A continuación en la Figura 5, se muestra un resumen de las células reguladoras (Lan et al., 2005).

**Figura 5.** Visión general de las células reguladoras. Se esquematizan las fuentes y acciones supresoras de varias subpoblaciones de células reguladoras: Los  $nT_{Reg}$ , linfocitos T  $CD8^+CD25^+$  y linfocitos T vírgenes son generados en el timo. Los linfocitos T  $CD4^+$  vírgenes pueden ser inducidos por varios métodos para convertirse en linfocitos T reguladores y ejercen función supresora de forma dependiente de citocinas. La supresión ejercida por los  $nT_{Reg}$  y los linfocitos T  $CD8^+CD25^+$  requiere interacciones célula-célula. Otras células reguladoras incluyen linfocitos NK, linfocitos T  $CD8^+CD28^-$  y linfocitos  $T^{\gamma\delta+}$ . Modificada de *Autoimmunity Reviews* 4 351–363, 2005.



## **1.9. TRATAMIENTOS DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

El tratamiento de la EM, bien sea inmunomodulador (interferon beta o acetato de glatíramero) o como inmunosupresor (azatioprina, ciclofosfamida o mitoxantrona, entre otros) es más eficaz durante las fases iniciales de la enfermedad, cuando la inflamación es más prominente (Fernandez, 2007). En los últimos años diversos estudios han puesto en evidencia que el tratamiento precoz de la EM marca la diferencia en su evolución. En efecto, se ha demostrado que un tratamiento precoz retrasa la discapacidad, presumiblemente al disminuir el daño al sistema nervioso causado por la enfermedad.

El tratamiento de la EM puede englobarse en dos categorías: tratamientos encaminados a controlar los brotes o exacerbaciones de EM; y tratamientos que modifican el curso de la enfermedad al disminuir el número y la severidad de los brotes, así como la progresión de la discapacidad. Se ha producido un progreso significativo en ambos tipos de tratamientos en la última década. Desde 1993, se han aprobado por la FDA americana cinco productos diferentes para la EM (Agencia Americana de Alimentación y Medicamentos) como tratamientos modificadores de la enfermedad. Entre ellos se incluyen tres interferones beta (IFN $\beta$ ) (Betaseron®, Avonex® y Rebif®) y dos productos no relacionados (Copaxone® y Novantrone®). Sin embargo, estas terapias no son siempre efectivas como monoterapia y en los últimos años se proponen diferentes terapias combinadas cuando la monoterapia no consigue controlar la actividad inflamatoria o bien se añade un tratamiento neuroprotector (fernandez O 2007). Las diferentes estrategias combinadas exceden el objetivo de esta Memoria y a continuación se resumen las características de los diferentes fármacos por separado.

### **1.9.1. Tratamiento sintomático del brote de Esclerosis Múltiple**

#### **Tratamiento con esteroides:**

Para los brotes de EM, se ha demostrado que los esteroides acortan la duración de los brotes al disminuir la inflamación en las lesiones de EM (Andersson and Goodkin, 1998; Marx, 1995). Sin embargo, no está indicado el tratamiento de mantenimiento con corticosteroides, dado que no se ha demostrado que afecte a la tasa de brotes, ni a la progresión de la EM.

Entre las terapias esteroideas se incluyen: Los glucocorticoides sintéticos adrenales (corticosteroides) tales como la prednisona, prednisolona, metilprednisolona, betametasona y dexametasona. No existen evidencias de que un determinado



tratamiento sea superior a otro. La pauta más ampliamente empleada es el tratamiento con metilprednisolona intravenosa (MPiv) (1 g/día de 3 a 5 días, según la sintomatología) (Milligan et al., 1987; Kupersmith et al., 1994):

**Mecanismo de acción:**

Se han descrito múltiples mecanismos de acción, entre los que se incluyen:

- Inhibición de la transcripción de ciertos genes implicados en la inflamación (por ejemplo, la E-selectina) lo que explicaría sus potentes efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores.
- Paliación del daño de la BHE.
- Disminución de las moléculas de adhesión solubles y
- Aumento en la expresión del mRNA de la IL-10.

## **1.9.2. Tratamientos que modifican el curso de la enfermedad**

### **1.9.2.1. Interferón-Beta**

**Preparados comerciales:**

Existen en la actualidad cuatro preparados comerciales de interferón disponibles para su uso clínico: Interferón beta natural, y tres formulaciones de interferón beta recombinante (dos son interferón beta-1a y uno es interferón beta-1b). El interferón beta-1a (IFN $\beta$ -1a) se comercializa como Avonex® y Rebif®. El interferón beta-1b (IFN $\beta$ -1b) se comercializa como Betaseron®.

**Propiedades farmacológicas:**

Aunque Avonex® y Rebif® son dos productos diferentes, ambos son IFN $\beta$ -1a recombinantes con estructuras químicas idénticas, están glicosilados y son producidos por células de ovario de hámster chino. El IFN $\beta$ -1b es producido por una técnica diferente de DNA recombinante en *Escherichia coli*, no está glicosilado, carece de la metionina N-terminal y tiene una sustitución de un residuo de cisteína por una serina en la posición 17 (Comi and Colombo, 2000).

**Mecanismo de acción:**

La administración de IFN $\beta$  de forma crónica ha demostrado disminuir la tasa de brotes y la progresión de la enfermedad. Su mecanismo de acción es complejo (Karp et al.,

2000; Yong et al., 1998) y su efecto a nivel inmunológico incluye los siguientes procesos:

- **Activación:** El IFN $\beta$  disminuye la activación y proliferación de las células T, reduciendo la expresión de moléculas necesarias para la presentación y reconocimiento antigénico (Yong et al., 1998; Jensen et al., 2006). Inhibe la expresión de moléculas del CPH de clase II, con disminución de la presencia antigénica en el SNC (Lu et al., 1995).
- **Amplificación:** Reduce la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ ) y produce un aumento de la respuesta linfocitaria de tipo Th2 mediante la inducción de las citocinas IL-4 e IL-10; (Rudick et al., 1998; Ochi et al., 2004), ayudando a prevenir una posterior activación y amplificación de la respuesta inmune.
- **Migración:** Produce inhibición de las metaloproteasas (Leppert et al., 1996) o alteración de la expresión de moléculas de adhesión (Calabresi et al., 1997). Disminuye la capacidad celular de interactuar con la VCAM unida a la membrana de la BHE, reduciendo la expresión de VLA-4 en las células T e incrementando los niveles de VCAM solubles (Bitsch et al., 2004), reduciendo la migración celular hacia el SNC y la permeabilidad de la BHE.
- **Efecto neuroprotector** asociado a sus propiedades antiinflamatorias (Sattler et al., 2006). El IFN $\beta$  reduce el daño neuronal y retrasa la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado en pacientes con EM tratados con IFN $\beta$ , un descenso en la atrofia cerebral (Hardmeier et al., 2005; Frank et al., 2004). Recientemente se ha reportado un aumento en la secreción de un factor de crecimiento nervioso, inducido por el IFN $\beta$  en células endoteliales cerebrales, que podría contribuir a la supervivencia neuronal (Biernacki et al., 2005).

**1.9.2.1.1. Betaseron®** (IFN $\beta$ -1b). El Betaseron es producido por Berlex Laboratories, Inc. Montville, NJ. El Betaseron fue el primer IFN $\beta$  en ser aprobado y comercializado en los EEUU.

**Resultados clínicos:**

- Reducción del índice de brotes de EM en un 34%.
- Ampliación del intervalo de tiempo entre los brotes.
- Reducción de la severidad de los brotes de EM.

- Disminución de la cantidad de lesiones acumuladas que se detectan por RMN (Goodin et al., 2002; Kappos et al., 2007).

**Administración:**

El Betaseron se administra, en dosis de 50 o 250 µg, en días alternos mediante inyección subcutánea.

**Indicaciones:**

El Betaseron ha sido aprobado para pacientes que presentan EMRR. Hay un estudio que ha demostrado alguna eficacia en la EMSP (Panitch et al., 2004).

**1.9.2.1.2. Avonex®** (IFNβ-1a). Producido por Biogen, Inc. Cambridge, MA, EEUU.

**Resultados clínicos:**

Se ha podido comprobar que el Avonex reduce el índice de progresión de la EMRR. También se ha demostrado que reduce el índice de brotes y la magnitud de daño acumulado que se ve en la RMN pero en un grado menor que otros agentes disponibles.

**Administración:**

El Avonex se administra por vía intramuscular semanalmente en una dosis inferior (30µg) que el Betaseron o el Rebif.

**Indicaciones:**

El Avonex se indica para el tratamiento de la EMRR.

**1.9.2.1.3. Rebif®** (IFNβ-1a). Producido por Serono, Inc. Basilea, Suiza.

**Resultados clínicos:**

Rebif reduce el número y la severidad de los brotes en un 30%, retrasa la progresión a incapacidad de un 70% a un 57% y reduce el número de lesiones nuevas y lesiones acumuladas, que se observan por RMN. Rebif se ha empleado en Europa y Canadá desde hace aproximadamente cinco años, pero sólo recientemente ha sido aprobado por la FDA para su utilización en EEUU después de una comparación exhaustiva con el Avonex (estudio EVIDENCE), el cual demostró la superioridad del Rebif en todos los estudios clínicos y los resultados de RMN.

**Administración:**

Rebif es idéntico en estructura química que Avonex®. Sin embargo, se aplica por vía subcutánea en dosis más altas y frecuentes que el Avonex® (22 ó 44 µg tres días semanales).

**Indicaciones:**

- -EM RR con 2 o más brotes en los últimos años.
- -EMSP con brotes.

Recientemente se ha aprobado la indicación del Rebif desde el primer brote y tras la confirmación del diagnóstico, mediante imagen por resonancia magnética, según los criterios de Mc.Donald.

Basándose en los diferentes estudios realizados, se ha considerado si existe una relación dosis-respuesta asociada al tratamiento con IFN $\beta$  en la EM, sin embargo es probable que el aparente efecto dosis dependiente, sea debido a diferencias en la frecuencia de administración del IFN $\beta$  más que a la dosis empleada. Asimismo, parece ser que la vía de administración del IFN $\beta$  puede influir en los efectos secundarios producidos por los diferentes tratamientos.

El tratamiento con IFN $\beta$  parece asociarse con la producción de anticuerpos neutralizantes, que se asocian con una menor eficacia clínica del tratamiento. La tasa de producción de anticuerpos neutralizantes parece ser menor en los pacientes tratados con IFN $\beta$ -1a que en los tratados con IFN $\beta$ -1b (Goodin et al., 2002).

**1.9.2.2. Copaxone® (Acetato de Glatíramero):** Producido por Teva Neuroscience, Toronto. Canadá.

**Propiedades farmacológicas:**

Preparado comercial: Consiste en un grupo de aminoácidos (ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina) que se asemejan a la mielina (Fridkis-Hareli and Strominger, 1998; Fridkis-Hareli et al., 1995).

**Mecanismo de acción:**

Actúa suprimiendo la respuesta inmunológica frente a la mielina. Actúa sobre los siguientes aspectos del proceso de la EM:

- Altera la activación de los linfocitos T autorreactivos e induce linfocitos Th1 anérgicos (Gran et al., 2000; Schmied et al., 2003).
- Puede promover el desarrollo de linfocitos T antiinflamatorios e inducir linfocitos T<sub>Reg</sub>.
- Modula las CPA hacia un perfil de respuesta anti-inflamatorio (Kim et al., 2004).

**Resultados clínicos:**

Reduce la frecuencia y severidad de los brotes con la misma eficacia que Betaseron y Rebif, pero con menos efectos sobre las lesiones de RMN.

**Administración:**

Copaxone se administra diariamente vía subcutánea a una dosis diaria de 20 mg.

**Indicación:**

Este tratamiento se utiliza como terapia alternativa en los pacientes EMRR sin importantes discapacidades funcionales en los que el IFN- $\beta$  no ha proporcionado ningún efecto positivo o bien en los que su administración ha producido serios efectos adversos o en los que no puede emplearse el IFN- $\beta$  por otros motivos (Bornstein et al., 1987; Johnson et al., 1995; Johnson et al., 1998).

**1.9.2.3. Novantrone® (Mitoxantrona):**

Producido por Immunex Corporation. Seattle, EEUU.

**Propiedades farmacológicas:**

Derivado de la antraciclina con elevada actividad antitumoral.

**Mecanismo de acción:**

- Efecto inmunosupresor sobre linfocitos T y B y actividad inmunomoduladora, causando menor secreción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (Neuhaus et al., 2006).
- Efectos citotóxicos a través de inducción de apoptosis en los linfocitos B.
- Reducción de la proliferación antígeno-específica de las CPA (Bellosillo et al., 1998; Chan et al., 2005; Neuhaus et al., 2005).

**Resultados clínicos:**

Novantrone es un citostático que se utiliza frecuentemente en el tratamiento de neoplasias malignas, con toxicidad elevada, que retrasa la progresión en la EM y disminuye el número de brotes en un 86%. Los hallazgos en la RMN son menos prometedores, ya que no se encuentra una reducción significativa de las lesiones captantes de gadolinio (Krapf et al., 2005).

**Administración:**

Se usa habitualmente, por un período limitado de tiempo y un número total limitado de dosis. Es necesario realizar una evaluación cardiológica antes de comenzar a utilizar este fármaco. Novantrone se administra por vía intravenosa ( $12\text{mg/m}^2$ ) cada 3 meses hasta el máximo acumulado de  $140\text{ mg/m}^2$  (menos de tres años).

**Indicación:**

Debido a sus potencialmente graves efectos secundarios (fundamentalmente miocardiopatía congestiva) y a su acumulación en el organismo debido a su elevada vida media (6 días), se ha decidido por consenso que sólo se debe utilizar en los pacientes con una elevada tasa de brotes y una incompleta remisión o en aquéllos en los

que con IFN $\beta$  no se ha obtenido eficacia (Edan et al., 1997; Millefiorini et al., 1997). Ha sido aprobado para los casos de EM que van empeorando progresivamente, incluyendo la EMSP y EMRR.

### **1.9.3. Otros tratamientos alternativos**

#### **1.9.3.1. Tysabri® (Natalizumab).**

Producido por Biogen Idec, Cambridge, Massachusetts, EEUU.

#### **Propiedades farmacológicas:**

Se trata de un anticuerpo humanizado anti-integrina. Se une al antígeno tardío VLA-4 que se une a la subunidad  $\alpha_4$  de la integrina  $\alpha_4\beta_1$  de la superficie de los linfocitos T activados.

#### **Mecanismo de acción:**

Desde el punto de vista inmunológico actúa sobre un aspecto del proceso de la EM: Previene la migración de los linfocitos T (con receptores VLA $\alpha_4\beta_1$ ) al cerebro (Yednock et al., 1992).

Induce una reducción del 66% en la tasa de brotes y alrededor de un 85% en el número de lesiones activas. Se realizaron dos ensayos clínicos en fase III en pacientes con EMRR (AFFIRM: Natalizumab y SENTINEL: Natalizumab en combinación con interferón beta-1a, Avonex, frente a placebo), tras la aprobación de la comercialización del Natalizumab en EEUU en Noviembre de 2004. Sin embargo, dos casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) obligaron a su retirada del mercado en el año 2005 (*FDA Public Health Advisory*: “Suspended marketing of Tysabri”. 28 de Febrero de 2005). Otro paciente con enfermedad de Crohn tratado con natalizumab también presentó LMP (Hohlfeld and Wekerle, 2005). En otro ensayo clínico realizado, el riesgo de desarrollar LMP en tratamiento con natalizumab se describió como muy bajo (aproximadamente de 1 caso por 1.000 pacientes) (Yousry et al., 2006). En la actualidad se ha aprobado su comercialización en EEUU. Se ha demostrado que el tratamiento combinado con natalizumab y dosis bajas de interferón beta-1a es significativamente más efectivo que la monoterapia con interferón beta-1a (Rudick et al., 2006).

#### **Administración:**

Cada cuatro semanas por infusión intravenosa en dosis de 300mg.

#### **Indicación:**

La FDA recomendó su comercialización como monoterapia para pacientes con brotes que no responden o no pueden tolerar otros tratamientos, avisando del riesgo de desarrollar LMP.

### **1.9.3.2. Gammaglobulinas policlonales**

#### **Mecanismo de acción:**

El mecanismo de acción de las gammaglobulinas en la EM podría ser la inactivación de los autoanticuerpos mediante la administración de anticuerpos (antiidiotipos), que regularían a la baja esos autoanticuerpos y el bloqueo de los receptores Fc. En pacientes con EM, las inmunoglobulinas han demostrado su probable beneficio porque contienen anticuerpos frente a autoanticuerpos anti-mielina y frente a otras proteínas del SNC.

Otros mecanismos de acción pueden ser: un descenso en la proporción de células T colaboradoras, activación de las células T supresoras, inhibición directa de la función de los linfocitos B, prevención de la activación del complemento (por medio de la inhibición de la interacción entre las células T activadas y el antígeno del SNC) y estimulación de la remielinización del SNC (Wiendl and Hohlfeld, 2002). Este último aspecto tendría gran importancia en la recuperación de déficits aparentemente irreversibles.

#### **Resultados clínicos:**

En dos ensayos clínicos (Sorensen et al., 1998; Achiron et al., 1998), se observó reducción del número de brotes y posible efecto de las inmunoglobulinas sobre la discapacidad. Ambos estudios se realizaron en pacientes con EMRR y solamente en uno de ellos se demostró eficacia por RMN (Sorensen et al., 1998). En otro estudio, (ECTRIMS, 2002) no se demostraron diferencias significativas entre el grupo tratado con inmunoglobulinas y el grupo placebo, ni en los parámetros clínicos ni en los de RMN. No obstante, es posible que sean eficaces si se emplean en fases precoces de la enfermedad. Son necesarios más ensayos clínicos para aclarar estos aspectos.

#### **Administración:**

Vía intravenosa, en dosis de 0,15-0,2 g/kg de peso, o en altas dosis; 1g/kg de peso, cada 21-28 días.

#### **Indicación:**

Su eficacia terapéutica ha sido establecida en una gran variedad de enfermedades del sistema nervioso periférico (Dalakas, 1997).

Aunque distintos autores no recomiendan su utilización como primer fármaco de elección, se ha podido observar en la forma de EMRR evidencias de su participación en el proceso de remielinización (Fazekas et al., 1997; Achiron et al., 1998; Sorensen et al., 1998).

### **1.9.3.3. Azatioprina**

#### **Propiedades farmacológicas:**

La azatioprina es un análogo inmunosupresor de una purina. Derivado de la mercaptopurina, tiene efectos inmunosupresores inespecíficos.

#### **Mecanismo de acción:**

No se conocen bien los efectos de la azatioprina en la EM, entre los que parecen estar:

- Reducción de la respuesta inmunológica: descendiendo las células NK y aumentando las células vírgenes  $CD4^+CD45RA^+$ .
- Descenso de los niveles de  $TNF\alpha$  (Salmaggi et al., 1997).
- Descenso de la acción de las células NK.
- Alteraciones en la producción de anticuerpos.

#### **Resultados clínicos:**

Los ensayos clínicos realizados con este fármaco no han proporcionado datos fiables acerca de su eficacia, por lo que los distintos documentos de consenso no han aprobado su utilización como terapia preferente. La combinación de azatioprina con  $IFN\beta$ -1a redujo la tasa de brotes y alguna de las medidas en RMN de la enfermedad. (Estudio “SENTINEL”). Sin embargo, en este estudio no se incluyó un grupo de pacientes tratados únicamente con azatioprina, con lo que es difícil determinar el impacto de cada fármaco por separado.

Se ha visto que reduce significativamente la tasa de brotes en pacientes con EMRR, EMSP y EMPP, pero no retrasa significativamente la progresión de la enfermedad en las formas de EM con brotes y progresivas (Bryant et al., 2001).

#### **Administración:**

En general, la dosis empleada es de 2-3 mg/kg/día.

#### **Indicación:**

Únicamente se recomienda a nivel profiláctico para aquellos enfermos que no han tolerado los fármacos de primera línea.

### **1.9.3.4. Otros tratamientos inmunosupresores**

Los resultados obtenidos de ensayos clínicos con otros fármacos o tratamientos inmunosupresores como la ciclosporina A, linomida, sulfasalazina, mielina oral,



plasmaféresis, trasplante autólogo de células madre, proteasas o inhibidores de fosfodiesterasas no han sido suficientemente concluyentes para justificar su utilización en la población general. Además, muchos de los ensayos han tenido que suspenderse por su elevada toxicidad.

### **Ciclofosfamida**

#### **Mecanismo de acción:**

Es un citostático, con propiedades antimitóticas e inmunosupresoras. Los mecanismos propuestos para explicar el efecto sobre el sistema inmunológico son:

- Descenso del número absoluto de células T o una normalización del porcentaje en sangre periférica de células T colaboradoras respecto a las células T supresoras, a través de la reducción de las células T colaboradoras.
- Reducción de las células B circulantes y descenso en la síntesis de IgG en el SNC.

#### **Reacciones adversas:**

Los efectos adversos son múltiples (existe un riesgo incrementado de cistitis hemorrágicas y una elevada frecuencia de neoplasias).

#### **Resultados clínicos:**

No existen muchos datos disponibles acerca de este fármaco en el tratamiento de la EM y los que hay son contradictorios (Group, 1991; Weiner et al., 1993).

#### **Administración:**

Los resultados de un estudio abierto, no controlado, con diez pacientes, sugieren la eficacia y seguridad de ciclos repetidos de ciclofosfamida en combinación con la administración de IFN $\beta$ -1a vía intramuscular, Avonex® o en días alternos de IFN $\beta$ -1b vía subcutánea, Betaferón® (Schreiber and Crabtree, 1992).

#### **Indicación:**

Los distintos grupos de investigación han considerado este fármaco válido en los pacientes jóvenes con EM progresiva que no han respondido a otras terapias (Khan et al., 2001).

### **1.9.3.5. Vacunas terapéuticas**

Se han realizado varios ensayos para lograr el desarrollo de una vacuna terapéutica para la EM. Algunos se basan basados en la administración de mielina oral, al ver que en animales suprimía la EAE, creando tolerancia (Noseworthy et al., 1999; Weiner, 1997). Sin embargo, en un ensayo realizado con pacientes con diferentes formas de EM en brote, no se vieron resultados satisfactorios (Francis et al., 1997). Otros estudios se

basan en la vacunación con péptidos del TCR (Gold et al., 1997), o en el empleo de anticuerpos contra el TCR (Stinissen et al., 1997) o contra el complejo formado por las moléculas CPH de clase II y la proteína básica de la mielina (Puri et al., 1997; Goodkin et al., 2000). En pacientes con la forma EMSP se probó una vacuna que consistía en un complejo solubilizado formado por el antígeno HLA-DR2 y un fragmento de la proteína básica de la mielina denominado 84-102 (AG284). Aunque la vacuna fue segura y bien tolerada se necesitarán futuros ensayos para determinar la actividad biológica y la eficacia clínica de este potente tratamiento (Goodkin et al., 2000).

## ***2. OBJETIVOS***

En la presente memoria se partió de la hipótesis de que los fármacos con demostrada eficacia clínica en la EM, como los glucocorticoides para el brote agudo de EM y el IFN $\beta$  como fármaco modificador del curso de la enfermedad, actúan sobre las células implicadas en la fisiopatología de la EM, es decir, sobre las CDs y los T<sub>Reg</sub>.

El propósito de este trabajo es conocer, con datos objetivos procedentes de un estudio observacional, en una muestra con un número significativo de casos, el papel de los fármacos estudiados sobre las células que intervienen en la fisiopatología de la EM en pacientes con EMRR seguidos en dos hospitales de asistencia terciaria, Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” y Hospital “Clínico San Carlos” de Madrid.

- I. Caracterizar el inmunofenotipo de las pCDs y mCDs, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en una muestra de pacientes con EMRR durante el brote de EM y tras el tratamiento con glucocorticoides a corto plazo. Estudiar el efecto de la MPiv sobre la diferenciación o maduración de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y las CDs *in vitro*.
- II. Caracterizar el inmunofenotipo de las CDs, las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (activados, reguladores y en diferentes estadios de diferenciación) y la función de los linfocitos T<sub>Reg</sub> en una muestra de pacientes con EMRR en remisión clínica previamente a iniciar tratamiento con IFN $\beta$ -1a y a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento con altas dosis de IFN $\beta$ -1a (44 $\mu$ g/día, tres veces por semana).
- III. Identificar los factores de riesgo y los marcadores predictivos de la respuesta clínica al interferón que permitan definir mejor a aquellos pacientes que van a responder al tratamiento.

### ***3. SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS***

### **3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se trata de un estudio epidemiológico, prospectivo, observacional, en una cohorte de pacientes con diagnóstico de EMRR definida seguida en dos hospitales de asistencia terciaria, Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” y Hospital “Clínico San Carlos”, que cubren a una población de unos 637.028 y 665.142 habitantes, respectivamente, de las zonas sur y noroeste de la Comunidad de Madrid.

El trabajo se dividió en dos apartados respondiendo al primer objetivo; y al segundo y tercer objetivos marcados, dando lugar a otros dos apartados dentro del capítulo de “Resultados”, con diferentes grupos de pacientes con EM, que se resume a continuación:

- I. Estudio descriptivo de 40 pacientes con EMRR (32 mujeres y 8 hombres) durante el brote y a los 5 días tras tratamiento con MPiv (1 g/día). Como grupo control, se estudiaron 21 individuos sanos (16 mujeres y 5 hombres) ajustados por edad y sexo.
- II. Estudio descriptivo de 23 pacientes con EMRR (13 mujeres y 10 hombres) en el estudio basal y a los 3, 6 y 12 meses de iniciar tratamiento con IFN $\beta$ -1a (44  $\mu$ g vía subcutánea tres veces por semana). En el momento inicial del estudio, los 23 pacientes se encontraban estables clínicamente. Como grupo control, se seleccionaron 26 controles sanos (13 mujeres y 13 hombres) ajustados por edad y sexo.

Para identificar si existen factores de riesgo y marcadores predictivos de la respuesta clínica al interferón se realizó un estudio comparativo entre los 23 pacientes con EM y un grupo control de 26 individuos sanos, que se utilizó para la comparación de todas las variables estudiadas. Se dividieron los pacientes en dos grupos, pacientes respondedores al tratamiento (libres de brotes o que no hubiesen aumentado la EDSS a lo largo del estudio) (Rio et al., 2006) y pacientes no respondedores, para estudiar posibles diferencias entre las variables analizadas en los dos grupos y determinar si alguna de ellas se correlacionaba con mejor evolución clínica al tratamiento con IFN $\beta$ -1a.

## **3.2. SUJETOS Y PERÍODO DEL ESTUDIO**

### **3.2.1. Estudio observacional de pacientes en brote y tras tratamiento con metilprednisolona**

En el Servicio de Neurología del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” se inició un estudio de 40 pacientes con EMRR definida (de acuerdo con los criterios de Mc. Donald) (McDonald et al., 2001), 32 mujeres y 8 hombres, durante el brote de EM en el periodo de tiempo comprendido entre enero de 2003 y diciembre de 2006. Se recogieron sus datos clínicos y de laboratorio, los cuales se procesaron conjuntamente en el Servicio de Inmunología del Hospital.

El brote se definió como la aparición de nuevos síntomas neurológicos o empeoramiento de los síntomas preexistentes con duración de más de 24 horas, tras un periodo de al menos 30 días de mejoría o estabilidad en ausencia de infección o fiebre. Dado que la mayoría de la actividad inflamatoria permanece silente clínicamente, y oculta tras los pacientes “en remisión”, seleccionamos los pacientes con brote de EM clínico.

Los pacientes se estudiaron en dos intervalos de tiempo diferentes, en el brote y tras 5 días del tratamiento con metilprednisolona intravenosa (MPiv) (1g/día). Todas las muestras de sangre se recogieron en las 4 primeras semanas desde la aparición de los síntomas de EM (mediana: 10,00±11,82 días). Los 40 pacientes presentaron en la RMN lesiones en la sustancia blanca cerebral y/o la médula espinal y datos de laboratorio (índice de IgG, y /o BO IgG consistentes con EM. Las BO IgG fueron detectadas por isoelectroenfoque. La severidad clínica de la enfermedad fue medida por la EDSS de Kurtzke (Kurtzke, 1983).

Los pacientes que presentaban trastornos de riñón, hígado, endocrinos, inmunológicos, inflamatorios o infecciosos fueron excluidos por medio de su historia clínica, examen físico, y análisis de laboratorio. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento anti-inflamatorio, inmunosupresor, inmunomodulador, esteroideo u hormonal al menos durante 3 meses antes del estudio. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes y el estudio fue aprobado por los comités éticos científicos del hospital General Universitario Gregorio Marañón.

En una primera parte del estudio, se analizaron mediante citometría de flujo de tres colores las subpoblaciones de células dendríticas (mieloides y plasmacitoides),

linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup>) de sangre periférica en los 40 pacientes con EMRR durante el brote. En paralelo, se analizaron las mismas subpoblaciones en el grupo control de 21 individuos sanos (16 mujeres y 5 hombres, ajustados por edad y sexo).

En una segunda parte del estudio, se analizaron mediante citometría de flujo de cuatro colores los diferentes estadios de diferenciación o maduración de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (vírgenes, memoria, memoria efectores y efectores), así como los linfocitos T CD8<sup>+</sup>TCR<sup>γδ</sup><sup>+</sup> de sangre periférica en 20 de los 40 pacientes con EMRR durante el brote. En paralelo, se estudiaron 18 controles sanos (12 mujeres y 6 hombres, ajustados por edad y sexo).

### **3.2.2. Estudio observacional de pacientes con EMRR clínicamente estables en el estudio basal y tras 3, 6 y 12 meses de tratamiento con Interferón beta-1a**

En los Servicios de Neurología del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" y del Hospital "Clínico San Carlos" de Madrid, se llevó a cabo un estudio observacional longitudinal en una cohorte de 23 pacientes con criterios definidos de EMRR (Poser et al., 1983; McDonald et al., 2001) durante el período comprendido entre diciembre de 2004 y octubre de 2006 (De Andrés et al., 2004).

Como ya se ha mencionado previamente, el brote se definió como la aparición de nuevos síntomas neurológicos o empeoramiento de los síntomas preexistentes con duración de más de 24 horas, tras un periodo de al menos 30 días de mejoría o estabilidad en ausencia de infección o fiebre.

A todos los pacientes se les realizó RMN, pruebas de laboratorio (índice IgG y/o bandas oligoclonales IgG) como parte de la evaluación de rutina en el momento del diagnóstico. La severidad clínica fue cuantificada usando la EDSS de Kurtzke (Kurtzke, 1983). La tasa anual de brotes fue calculada como el número de brotes por año/número de pacientes.

Todos los pacientes recibieron IFNβ-1a (Rebif®), 44 µg vía subcutánea tres veces por semana. En el momento del estudio, ninguno de los pacientes experimentó un brote al menos en los 2 meses antes, ninguno recibió tratamiento inmunosupresor, ni inmunomodulador, ni tratamiento hormonal en los 2 meses previos a la extracción de



sangre, ni padecieron infección. Se excluyeron los pacientes con otras enfermedades inflamatorias o autoinmunes u otras enfermedades médicas graves, o con resultados de laboratorio anormales (bioquímica, recuento sanguíneo completo, proteína C-reactiva, test de función tiroidea, auto-anticuerpos antinucleares, anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana, anticuerpos frente a hepatitis B y C y análisis de orina).

Los pacientes fueron monitorizados en el estudio basal antes de iniciar el tratamiento, con una historia médica completa y un examen físico y neurológico. Se realizaron reevaluaciones completas a los 3, 6 y 12 meses de iniciar el tratamiento con IFN $\beta$ -1a. Las muestras se tomaron en las 48 horas de la inyección del IFN $\beta$ -1a. En caso de posibles brotes de EM a lo largo del estudio, se permitió el uso de metilprednisolona intravenosa, 1g al día durante 3-5 días. Como grupo control, se seleccionaron 26 controles sanos, ajustados por edad y sexo. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes y el estudio fue aprobado por los comités éticos científicos del hospital.

Se recogieron los datos clínicos descritos previamente y los datos de laboratorio y se analizaron mediante citometría de flujo de cuatro colores las subpoblaciones de células dendríticas (mieloides y plasmacitoides) (Figura 7), linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> activados y reguladores, linfocitos T CD8<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, así como los diferentes estadios de diferenciación o maduración de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8<sup>+</sup> (vírgenes, memoria, memoria efectores y efectores) de sangre periférica de pacientes con EMRR en el estudio basal y a los 3, 6 y 12 meses de iniciar tratamiento con IFN $\beta$ -1a. Asimismo, se compararon los datos de los pacientes que sufrieron brotes durante el tratamiento o que progresaron en la EDSS frente a los pacientes que permanecieron asintomáticos.

El número medio de estudios realizados a cada paciente con EM fue de 4,7 $\pm$ 0,5 siendo el número mínimo de estudios realizados 4 y el máximo 6. Las características de los diferentes grupos de pacientes con EM y de los controles están definidas en cada uno de los subapartados de resultados.

Los diferentes grupos estudiados, se describen a continuación:

- **Grupo “Brote EM”:** Grupo principal del estudio. Pacientes con EMRR en brote (n=40).

- **Grupo “EM basal”**: Pacientes con EM en remisión clínica en el momento basal del estudio, antes de iniciar tratamiento con IFN $\beta$ -1a (n=23).
- A su vez, el Grupo “EM basal” se clasificó en dos grupos: se definió un **Grupo “Respondedores”**: Pacientes que cumplen criterios diagnósticos de EMRR pero que permanecieron libres de brotes o que no aumentaron el EDSS durante el periodo de seguimiento (1 año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a) (n=14) y un grupo **“No-respondedores”**: Pacientes que cumplen criterios de EMRR pero que tuvieron algún brote o que aumentaron el EDSS durante el periodo de seguimiento (n=9).

### **3.3. PROTOCOLO CLÍNICO. VARIABLES ESTUDIADAS**

Los datos de cada paciente se recogieron en un protocolo de trabajo. Este constaba de 3 hojas en las que se ordenaron todas las variables de estudio: información general de filiación, tratamiento recibido; en la segunda hoja se registraron todos los datos clínicos de cada visita, exploración general y neurológica (escala EDSS), pruebas de neuroimagen en caso de realizarse, bioquímica sanguínea y hemograma; en la tercera hoja se registraban los cambios de situación (salida del estudio por cualquier causa).

#### **3.3.1. Diagnóstico por neuroimagen**

Se registraron los hallazgos de los informes de exploraciones neurorradiológicas (TC; RMN, ecografía y SPECT).

### **3.4. TÉCNICAS DE LABORATORIO**

#### **3.4.1. Extracción y procesamiento de las muestras de sangre**

Las muestras de sangre periférica de los pacientes y los controles se tomaron entre las 9:00 h y las 10:00 h de la mañana, mediante punción venosa, se recogieron en tubos de EDTA estériles (K2E), y se procesaron en las 2 horas de la recolección. Las muestras se incubaron con los apropiados anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los eritrocitos se lisaron con solución lisante FACs (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) y las muestras se lavaron con solución fosfato-salina (“*Phosphate buffered saline*”; PBS) posteriormente. Las CDs y las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se analizaron por citometría de flujo de 3 y 4-colores según el procedimiento descrito anteriormente. (Benito et al., 1997); (Hafler et al., 2005). Se emplearon controles isotípicos para determinar los niveles de

fluorescencia de fondo. La adquisición y el análisis se realizó en un citómetro de flujo FACScan (3 colores) o FACScalibur (4 colores) (Becton-Dickinson, San José, California), empleando el software Cell-Quest.

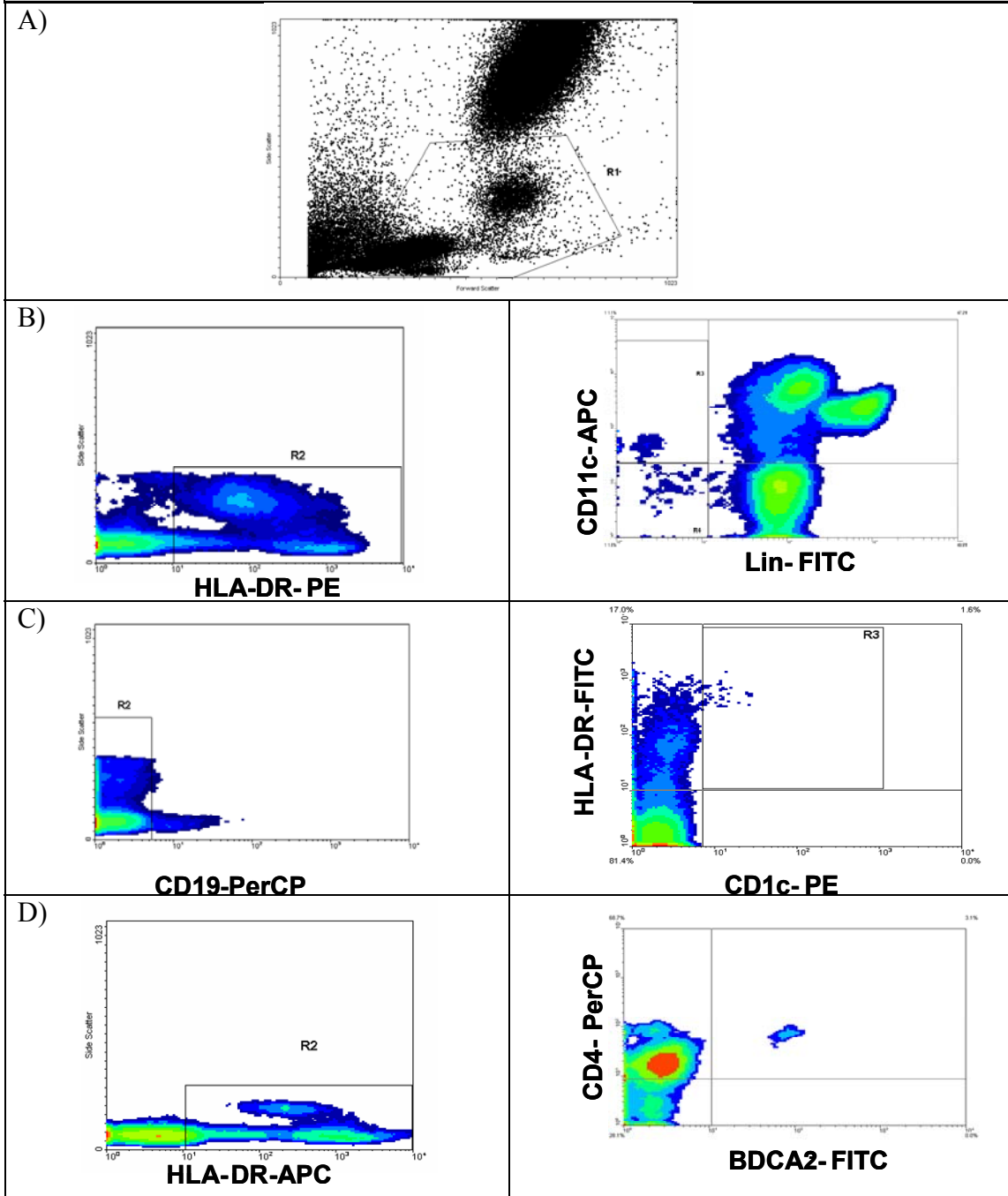
### 3.4.2. Inmunofenotipaje de las subpoblaciones de células dendríticas de sangre periférica

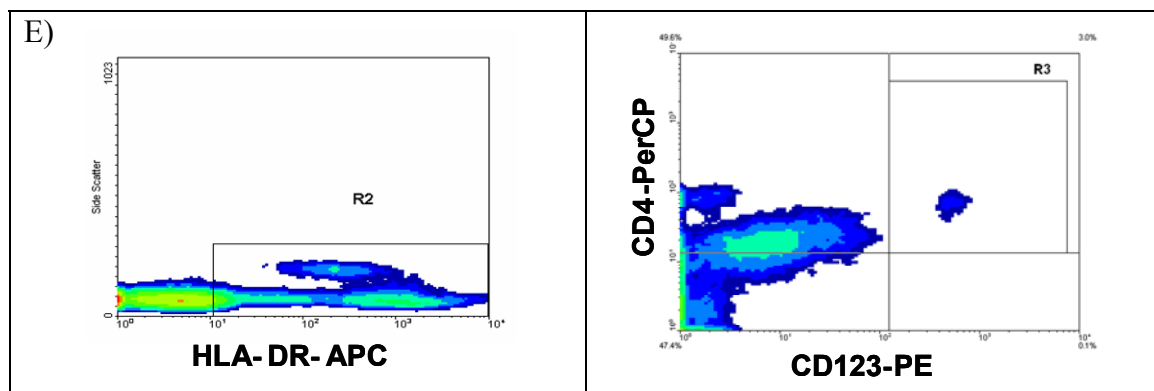
Los números de pCDs y mCDs fueron medidos por citometría de flujo utilizando metodología de análisis de eventos raros. Empleamos citometría de flujo de sangre total para preservar la composición original de las poblaciones mononucleares (Vuckovic et al., 2004).

Las células fueron marcadas por marcaje directo con los siguientes anticuerpos conjugados: CD1c PE (BDCA-1, Miltenyi Biotec, Alemania), CD303 FITC (BDCA-2, Miltenyi Biotec), CD123 PE, CD19 PCP, CD11c PE, HLA-DR FITC, PE, PerCP y APC de Becton Dickinson, EEUU. Las CDs se definieron como linaje negativas, empleando marcadores de linfocitos T, B, monocitos, y células NK (Lin cocktail CD3/CD14/CD19/ CD56/CD16/CD34-FITC, Becton Dickinson), y positivas para HLA-DR. Las muestras se adquirieron antes de las 2 primeras horas del marcaje. Adquirimos 100.000 eventos dentro de una puerta de células mononucleares definida por unas condiciones concretas de tamaño (*Forward-scatter*, FCS) y complejidad (*Side-scatter*, SSC) (Región 1, R1) (Figura 7A). Se establecieron diferentes estrategias de selección para definir las diferentes subpoblaciones de CDs circulantes:

Creando una región (R2) positiva para HLA-DR dentro de R1 y analizando CD11c frente a Lin cocktail (Fig. 7B), las células que eran CD11c<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> se consideraron mCDs y las células que eran CD11c<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup> se consideraron pCDs. Creando una región como CD19 negativa (R2) en R1, las células que eran BDCA-1<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> se consideraron mCDs (Fig. 7C). Alternativamente, definiendo otra región (R2) como HLA-DR positiva en R1, las células que eran BDCA-2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Fig. 7D) o bien, CD123<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> se consideraron pCDs (Fig. 7E). Los porcentajes de cada subpoblación celular se expresaron con respecto al total de células mononucleares (R1).

**Figura 7.** Caracterización de las CDs: A) puerta de células mononucleares (Región 1, R1) B) HLA-DR<sup>+</sup> (región R2) linaje negativas según expresión CD11c; C) CD19<sup>-</sup> (región R2) HLA-DR<sup>+</sup> CD1c<sup>+</sup> mCDs; D) HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>BDCA2<sup>+</sup> pCDs, E) HLA-DR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup> pCDs.





### 3.4.3. Inmunofenotipaje de las subpoblaciones linfocitarias ( $CD4^+$ y $CD8^+$ ) de sangre periférica

Las subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  se analizaron por citometría de flujo de 3 y 4 colores. Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron de Becton-Dickinson (BD Immunocytometry Systems, San José, California, EEUU), excepto el  $CD38$ -FITC (Immunotech, Marsella, Francia) y el  $GITR$  (R&D systems, Abingdon, RU). Se emplearon los correspondientes controles isotípicos. La adquisición y el análisis se realizó en un citómetro de flujo FACScalibur (BD, San José, California, EEUU), empleando el Software Cell Quest. En un análisis de dot plot de FSC frente a SSC se dibujó una puerta para seleccionar los linfocitos, y se adquirieron un total de 20,000 eventos.

#### 3.4.3.1. Subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+$

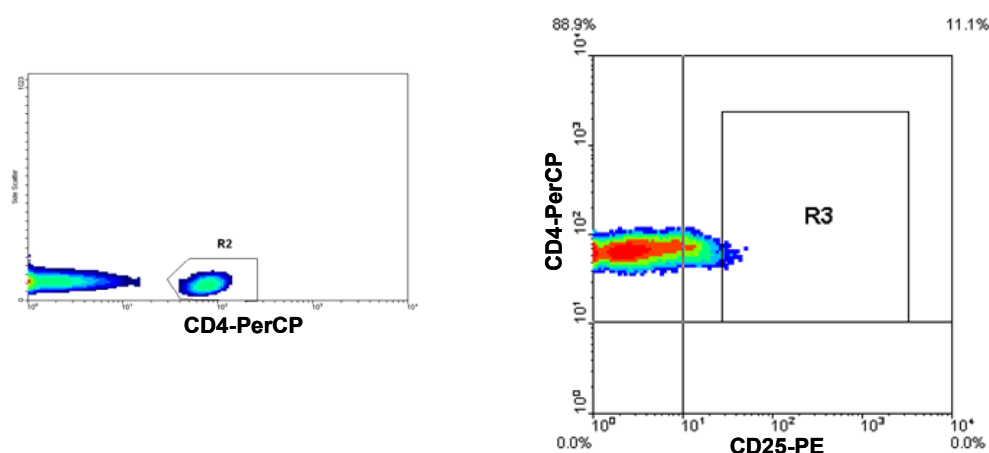
La identificación de los  $T_{Reg}$  se realizó según se ha descrito previamente (Sanchez-Ramon et al., 2005). Los  $T_{Reg}$  se definieron como  $CD4^+CD25^+$  (intensidad de fluorescencia media y alta) y  $CD4^+CD25^{+High}$  ( $CD25$  de alta intensidad). Las células  $CD4^+CD25^{low}$  (de baja intensidad) se excluyeron de los análisis de  $T_{Reg}$ , ya que incluyen la mayoría de linfocitos T  $CD4^+$  activados (Figura 8). Los linfocitos T activados se definieron como  $CD4^+CD38^+HLA-DR^+$  (Resino et al., 2001).

Los linfocitos T  $CD4^+$  vírgenes se definieron como  $CD4^+CD45RO^-CD27^+$ , los linfocitos T  $CD4^+$  de memoria central como  $CD4^+CD45RO^+CD27^+$  y los de memoria efectores como  $CD4^+CD45RO^+CD27^-$ .

Todas las poblaciones se expresaron como porcentaje de linfocitos T  $CD4^+$  totales. Para marcaje intracelular con anti-CTLA-4-PE (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California) y anti-FoxP3-PE (eBioscience, San Diego, California, EEUU), las células

se marcaron primero en superficie con anti-CD25-FITC, CD4-PerCP, y CD28-APC, según se ha descrito previamente. Las células fueron después fijadas, permeabilizadas y marcadas con anti-CTLA-4-PE o anti-Foxp3-PE, según las instrucciones del fabricante.

**Figura 8.** Identificación de linfocitos T reguladores por citometría de flujo. (A) La región R1 se creó para seleccionar los linfocitos T totales, la región R2 se creó para seleccionar los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales. (B) Estrategia de selección para definir los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (R3) en la región R2 (Sánchez Ramón *et al.* Immunology Letters 2005).



### 3.4.3.2. Subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup>

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores se definieron como CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Los linfocitos T activados se definieron como CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes se definieron como CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria central como CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, los CD8<sup>+</sup> memoria-efectores (memoria en estado intermedio de diferenciación) como CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> y los CD8<sup>+</sup> efectores como CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>. Todas las subpoblaciones celulares se expresaron como porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales.

## 3.5. ANÁLISIS DE APOPTOSIS MEDIANTE MARCAJE CON ANEXINA-V-FITC

Para estudiar el efecto apoptótico de los corticoides sobre las CDs (mCDs y pCDs) y sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *ex vivo* o activados, se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, RU), las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de controles sanos (n=5). Posteriormente las células se dejaron a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml en medio completo al 10% de suero de ternera (M10%FCS) (ver composición en apartado: Medios, reactivos), y se

cultivaron 2 ml, durante 24 horas. En paralelo, se cultivaron 2 x 10<sup>6</sup> células más, en M10%FCS a las que se adicionó MP a una concentración final de 0,4 µg/ml. A las 24 horas de cultivo, se realizó citometría de flujo con los siguientes puntos:

- Células control sin marcaje.
- Anexina V-FITC/BDCA1-PE/CD4-PerCP.
- Anexina V-FITC/BDCA2-PE/CD4-PerCP.
- Anexina V-FITC/CD3-PE/CD4-PerCP.

Para distinguir entre las células apoptóticas y necróticas, se añadió yoduro de propidio (PI) (R&D Systems, Inc. Mineápolis, EEUU) a los tubos control y se realizó una puerta de análisis para excluir las células necróticas (PI positivas).

Se realizaron estudios en paralelo con blastos estimulados (obtenidos a partir de CMSP estimuladas durante 48 horas con fitohemaglutinina a una concentración de 1 µg/ml en M10%FCS).

El marcaje con anexina V (R&D Systems, Inc. Mineápolis, EEUU) se realizó según las recomendaciones del fabricante, empleando un tampón rico en Ca<sup>2+</sup> (buffer Anexina V. Ver composición en el apartado: Medios, reactivos).

### **3.6. ESTUDIOS DE MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS. EFECTOS DE LA METILPREDNISOLONA**

Para obtener CDs derivadas de monocitos, se aislaron primero las CMSP de varios donantes sanos. Posteriormente, se realizó purificación inmunomagnética de los monocitos CD14<sup>+</sup>, mediante un cocktail de bolitas magnéticas (Miltenyi Biotech, Bisley, RU). A continuación, se cultivaron a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml en medio libre de suero (AIM-V. ®Gibco. Paisley, RM), con adición (a día 0 y cada 2 días de cultivo) de GM-CSF (40ng/ml) e IL-4 (100ng/ml), durante 6 días, obteniéndose así las CDs derivadas de monocitos en estado inmaduro. A continuación, se recogieron las células, se centrifugaron y se resuspendieron nuevamente en AIMV-V+GM-CSF+IL-4. Se cultivaron en placa, dividiéndolas en tres puntos; Células control, células más LPS (lipopolisacárido de la pared bacteriana) (100ng/ml) y células más MP (0,4 µg/ml) y se dejaron incubar durante 48 horas más. Posteriormente se realizó citometría de flujo para ver marcadores de maduración (CD40, CD80, CD83, CD54 y HLA-DR) en los tres puntos.

### 3.7. ESTUDIOS FUNCIONALES DE SUPRESIÓN DE LOS T<sub>Reg</sub> *ex vivo* SOBRE RESPUESTAS LINFOPROLIFERATIVAS

De los 23 pacientes con EMRR en tratamiento con IFN $\beta$ -1a, se seleccionó un subgrupo aleatorio de 10 pacientes para estudiar la función supresora de los T<sub>Reg</sub> *ex vivo*, en el estudio basal, a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a. Como grupo control, se seleccionaron 5 controles sanos. Para realizar los estudios de supresión, se aislaron primero las CMSP. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se purificaron en dos pasos por medio de técnicas de purificación inmunomagnéticas: Primero se purificaron, por depleción, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, mediante un cocktail de bolitas magnéticas (Miltenyi Biotech, Bisley, RU) y posteriormente por selección positiva, los linfocitos T CD25<sup>+</sup> de intensidad de fluorescencia media y alta (T<sub>Reg</sub>), mediante el uso de bolitas magnéticas anti-CD25. De esta forma, la subpoblación de linfocitos CD25<sup>low</sup> quedó excluida, la cual incluye mayoritariamente linfocitos T de activación temprana. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (denominados en la literatura como respondedores) se obtuvieron a partir de los pasos de lavado. La pureza se aumentó pasando las células dos veces por la columna. La pureza fue medida y fue siempre superior al 93%. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (respondedores) ( $50 \times 10^3$  células/pocillo) se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 soluble (1  $\mu$ g/ml) (BD Biosciences) en placas de 96-pocillos de fondo en U, por duplicado. Para cuantificar la función reguladora, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> se cocultivaron con respondedores autólogos a diferentes ratios, de los cuales, se escogió la relación respondedor: supresor de 2:1, un ratio subóptimo para los T<sub>Reg</sub>, en el cual las diferencias en el porcentaje de inhibición de las respuestas linfoproliferativas por parte de los CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> entre los controles y los pacientes EM fueron evidentes. Para el cultivo mixto linfocitoario (CML) se empleó como células presentadoras de antígeno una mezcla de seis líneas celulares de linfocitos B inmortalizados con sobrenadante del virus de Epstein-Barr (BLCLs), inactivadas con mitomicina C (Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (respondedores) ( $50 \times 10^3$  células/pocillo) se estimularon con BLCLs a una relación de 10:1 (10 Respondedores: 1 BLCL) en 300  $\mu$ l de volumen final de M10%FCS, en placas de 96-pocillos. Tras 6 días de cultivo, las células se pulsaron con 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-Timidina) durante las últimas 6 h de cultivo. Las células se recogieron en unos filtros de fibra de vidrio por medio de un filtrador automático (Tomtec) y la radioactividad incorporada a las células se midió mediante un contador Microbeta



Trilux (Wallac, Finlandia). La actividad estimuladora se calculó como la media geométrica de las cuentas por minuto (c.p.m). El efecto inhibidor de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> de los pacientes con EM, se midió en los ratios descritos anteriormente, antes y tras 3, 6 y 12 meses de tratamiento con IFNβ-1a. La actividad supresora de los T<sub>Reg</sub> se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó de la siguiente manera [ $100 \times (\text{media de las c.p.m en condiciones sin T}_{\text{Reg}} - \text{media de las c.p.m medida en condiciones con T}_{\text{Reg}}) / \text{c.p.m en condiciones sin T}_{\text{Reg}}$ ] frente al número de T<sub>Reg</sub>. En cultivo, los T<sub>Reg</sub> purificados solos, estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 o con BLCLs fueron siempre anérgicos, y cuando se cocultivaron con linfocitos T respondedores, la media de las cuentas por minuto fue siempre menor que en el caso de los linfocitos T respondedores solos, lo cual implica un efecto supresor por parte de los T<sub>Reg</sub>.

### **3.8. ADICIÓN *in vitro* DE INTERFERÓN BETA-1a AL CULTIVO MIXTO LINFOCITARIO**

Siguiendo las indicaciones del experimento anterior, se añadió IFNβ-1a (Rebif®) por duplicado en los experimentos de CML, a la misma concentración que el pico máximo encontrado en el suero de los pacientes a las 3 horas tras la inyección de una dosis única (5000 UI/μl) (Sero no Europe Ltd, package insert, 2003), tanto a los linfocitos T respondedores como a los cocultivos de los respondedores y los T reguladores y posteriormente se analizó la proliferación celular según se describió anteriormente.

### **3.9. ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE MARCAJE CON CARBOXIFLUORESCEIN DIACETATO SUCCINIMIDIL ESTER (CFSE)**

Las células se resuspendieron en PBS para la tinción con el colorante fluorescente CFSE. Se incubaron con CFSE (1μM) durante 10 minutos a 37°C, en agitación cada minuto (Lyons, 2000; Lyons and Parish, 1994). Las células teñidas con CFSE se cultivaron *in vitro* con un estímulo apropiado (anti-CD3 y anti-CD28 0,5μg/ml). Tras 5 días de cultivo, las células se marcaron con anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (CD25-PE) y PerCP (CD4-PerCP).

Determinación de eventos mitóticos y frecuencias de precursores. Los picos de división (determinados por intensidad de CFSE) se marcaron de 0 a n. Dado que un linfocito T dividiéndose n veces genera 2<sup>n</sup> células hijas, si obtenemos ocho, entonces un precursor tuvo que dividirse exactamente 3 veces para generar estas 8 células (2<sup>3</sup>=8). Aplicando

esta relación matemática, el número de precursores en división se calculó a partir del número de células hijas tras cada pico de división (Wells et al., 1997).

### **3.10. ESTUDIOS FUNCIONALES DE SUPRESIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> REGULADORES *ex vivo* SOBRE RESPUESTAS LINFOPROLIFERATIVAS**

Los estudios funcionales se realizaron a partir de CMSP aisladas, según se ha descrito previamente. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se purificaron a partir de linfocitos T mediante técnicas de purificación inmunomagnética en 3 pasos: Primero se realizó la purificación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> por depleción por medio de bolitas magnéticas anti-CD4 (Miltenyi Biotec, Bisley, UK); posteriormente se purificaron los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> por medio de bolitas magnéticas anti-CD28 y se realizó selección positiva de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> por medio de bolitas magnéticas anti-CD25. La pureza de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> siempre fue superior al 90%. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (50x10<sup>3</sup>) se estimularon con BLCLs a un ratio de 10:1 en un volumen final de 300µl de M10%FCS, en placas de 96 pocillos de fondo en U en duplicado. Para cuantificar la función reguladora, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se co-cultivaron con linfocitos T CD4<sup>+</sup> autólogos a diferentes ratios (1:1, 1:2, 1:4). Tras 6 días de cultivo, las células se pulsaron con 1 µCi de timidina tritiada y se incubaron 6 horas. Posteriormente las células se filtraron, y se midió la radioactividad incorporada a las células en un contador de centelleo. La actividad estimuladora se calculó en c.p.m. El efecto inhibidor de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se midió en los cocientes descritos. Se realizaron los mismos experimentos en paralelo con los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, para comparar la supresión ejercida por los dos tipos celulares.

### **3.11. EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE Foxp3**

Los extractos de RNA total se obtuvieron a partir de T<sub>Reg</sub> (purificados de pacientes con EM y de controles) estimulados durante 5 días. El RNA se extrajo empleando el kit QIAmp®RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, CA, USA). La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), se realizó en un paso empleando el Kit AccessQuick™ RT-PCR System (Promega, WI, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los cebadores empleados para el gen Foxp3 fueron descritos previamente por Tommasini (Tommasini et al., 2002) para obtener un producto de amplificación de 152 pares de bases (pb). Como control interno de la RT-

PCR se empleó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GADPH) humana. Los cebadores para la GADPH fueron descritos previamente por Frey (Frey et al., 1998) para obtener un producto de amplificación de 627 pb. Tras la reacción de la transcriptasa inversa (RT) (45°C 45 minutos), la PCR se realizó en 35 ciclos (94°C 15 segundos, 56°C 30 segundos, 72°C 1 minuto y 45 segundos) y un ciclo de extensión final (72°C 10 minutos), empleando el termociclador Perkin Elmer 9700. Posteriormente se detectó el producto la RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio.

### **3.12. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Para obtener las imágenes por microscopía electrónica, los linfocitos T<sub>Reg</sub> purificados se estimularon durante 24 horas con  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28 o con BLCLs, según se ha descrito previamente. Posteriormente, las células se adhirieron a un portaobjetos que contenía poli-L-lisina (50.000 células por cristal) y se dejaron incubar durante 2-3 horas a 37°C. Posteriormente, se fijaron con glutaraldehído al 2%. Las muestras se secaron en un desecador de vacío (por medio de CO<sub>2</sub> en el punto crítico) y se recubrieron con una película metálica de oro utilizando un sistema de pulverización (“sputtering”), antes de ser introducidas en el microscopio electrónico de barrido. El microscopio empleado para tomar las fotos de las preparaciones fue de la marca JEOL JSM-T300.

### **3.13. TINCIÓN DE PERFORINA**

Se purificaron los linfocitos T<sub>Reg</sub> de un donante sano. Se cultivaron 100.000 T<sub>Reg</sub> durante 24 horas en M10%FCS, otros 100.000 T<sub>Reg</sub> se estimularon durante 24h con la mezcla de BLCLs a una relación de 1:10 y otros 100.000 T<sub>Reg</sub> se cultivaron con los BLCLs más IFN $\beta$ -1a. Las células se fijaron en portaobjetos con poly-L-Lisina durante 2 horas, tras lo cual, se extrajo el medio, se lavaron con PBS y se fijaron durante 10 minutos con alcohol de 96°. Se dejaron secar y posteriormente se lavaron con PBS y se realizó tinción inmunohistoquímica utilizando como enzima marcador la peroxidasa, según el siguiente protocolo:

- 1- Bloqueo de la peroxidasa endógena, 10 minutos.
- 2- Lavado con PBS
- 3- Incubación con el anticuerpo primario perforina (dilución 1:10; Novocastra, Newcastle, RU), 45 minutos
- 4- Lavado con PBS

- 5- Incubación con polímero dextrano marcado con peroxidasa (Dako Real™ EnVision™, Carpintería, CA), 30 minutos.
- 6- Lavado con PBS
- 7- Revelado con diaminobencidina (DAB), 10 minutos
- 8- Lavado con PBS
- 9- Lavado con agua destilada
- 10- Contraste con hematoxilina de Harris, 2 minutos
- 11- Lavado con agua
- 12- Deshidratación con alcoholes de 96° y 100°, aclaración y montaje.

### **3.14. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Y DE GRANZIMA-B**

Las citocinas IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  y la granzima-B se midieron en los sueros de los pacientes, alicuotados y congelados previamente a -70°C hasta su uso. Se hicieron las determinaciones en el estudio basal y a los 12 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a.

Las concentraciones de citocinas se determinaron mediante enzimoimmunoensayo (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (DIACLONE).

### **3.15. MEDIOS, REACTIVOS**

Todas las células fueron cultivadas en RPMI 1640 (Bio Whitaker Europe, Verviers, Bélgica), suplementado con 10% de suero de ternera fetal, inactivado con calor, (foetal calf serum, FCS) (Gibco, Paisley, RU), penicilina (100 IU/ml; Continental Pharma, Bruselas, Bélgica), estreptomycin (100  $\mu$ g/ml; Continental Pharma), L-glutamina 2mM. Las citometrías con anexina V, se realizaron empleando el buffer anexina-V 1X (composición: H<sub>2</sub>O destilada, HEPES 10mM, NaCl 150mM, KCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8mM) y AnexinaV-FITC (Beckton Dickinson, California, EEUU)

Para las purificaciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> reguladores, se empleó Buffer Macs (composición: PBS, EDTA 2,5mM, BSA al 0,5%).

### **3.16. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS**

#### **3.16.1. Procesamiento de los datos**

Los valores de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> se expresaron en porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> totales y las CDs mieloides y plasmacitoides en porcentaje de CMSP. Los datos se expresaron como la media con la desviación estándar (DE), la mediana y el rango intercuartílico (RI).

### **3.16.2. Distribución de las variables**

#### **3.16.2.1. Prueba ji-Cuadrado de Pearson**

Mide la asociación entre dos variables cualitativas o categóricas. Se contrasta si ambas variables son o no independientes (Armitage and Berry, 1992b).

#### **3.16.2.2. Test exacto de Fisher**

Variante de la prueba ji-cuadrado de Pearson para tablas 2x2 que incluye la corrección por continuidad de Yates. Es una alternativa cuando el tamaño muestral es pequeño (Armitage and Berry, 1992b).

### **3.16.3. Análisis de supervivencia**

Es un conjunto de técnicas estadísticas apropiadas para estudios en los que un sujeto es seguido durante un periodo de tiempo y en el cual se observa la presencia o ausencia de un determinado suceso. Su objetivo es describir las probabilidades de ocurrencia y la evolución de la tasa de incidencia del suceso a lo largo del seguimiento (Armitage and Berry, 1992a).

#### **3.16.3.1. Método de Kaplan-Meier**

Dada un variable dependiente cuyos valores corresponden al tiempo transcurrido hasta que ocurre un determinado suceso final, el objetivo de este análisis, es estimar en función del tiempo, la probabilidad de que ocurra dicho suceso (Armitage and Berry, 1992a).

#### **3.16.3.2. Regresión de Cox**

Consiste en obtener una función lineal de variables independientes (cuantitativas o cualitativas) que permita estimar en función del tiempo, la probabilidad de que ocurra un suceso que viene determinado por la variable dependiente (Armitage and Berry, 1992a).

#### **3.16.3.3. Función de supervivencia**

Probabilidad de que un suceso no aparezca hasta pasado un periodo de tiempo igual o superior a  $t$ . Su representación gráfica consiste en situar en el eje de abscisas el tiempo de seguimiento y en el de ordenadas la probabilidad de que no aparezca el suceso

estudiado. Permite seguir la evolución de un grupo de pacientes desde un estado inicial hasta uno final (Armitage and Berry, 1992a).

### **3.16.4. Pruebas paramétricas**

#### **3.16.4.1. Coeficiente de correlación lineal de Pearson (r)**

Este coeficiente permite estudiar la fuerza de asociación lineal entre dos variables. Dicha fuerza será nula (asociación lineal inexistente) si  $r=0$ , aumentando a medida que el valor de  $r$  se aproxima a 1 o a -1. El signo del coeficiente  $r$  indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo (Armitage and Berry, 1992c).

#### **3.16.4.2. Análisis de la varianza**

La comparación de las medias de cada variable en los distintos grupos estudiados se efectuó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Este análisis estudia la variabilidad entre los grupos y dentro de los grupos. La F Snedecor detectará si las medias de al menos un grupo difiere del resto (Armitage and Berry, 1992b).

El análisis de la varianza exige el cumplimiento de una serie de condiciones para poder ser aplicada: La variable ha de seguir una distribución normal en los grupos estudiados y las varianzas han de ser homogéneas entre los grupos. La normalidad de cada una de las variables se comprobó previamente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; la homogeneidad de las varianzas se comprobó mediante la prueba de Levene.

#### **3.16.4.3. Regresión lineal múltiple**

El análisis de regresión es una técnica estadística de análisis multivariante que estudia las variaciones de una variable cuantitativa continua en función de una o varias variables cuantitativas continuas o dicotómicas. La variable cuya variabilidad se quiere estudiar es la variable dependiente y las variables en función de las cuales varía son las variables independientes (Carrasco and Hernán, 1993a).

Este tipo de análisis exige que todas las variables incluidas sigan una distribución normal, y que la asociación entre cada una de las variables independientes y la variable dependiente sea de tipo lineal (ya que la ecuación de regresión que proporciona este análisis es de tipo lineal). Esto se comprobó previamente mediante análisis bivariante aplicando el análisis de correlación lineal de Pearson.

Se comprobó la ausencia de multicolinealidad entre las variables independientes. La multicolinealidad consiste en la existencia de un alto grado de correlación entre las distintas variables independientes incluidas en la ecuación de regresión. Aunque la existencia de multicolinealidad no imposibilita la obtención de una ecuación de regresión, sí puede alterar la utilidad e interpretabilidad de la misma.

### **3.16.5. Regresión Logística**

El modelo de regresión logística permite relacionar factores cuantitativos y categóricos con respuestas binarias. La variable dependiente (Y) es una variable dicotómica y las variables independientes (Xi), una o varias, pueden ser cuantitativas y/o categóricas. Los parámetros del modelo se estiman por el método de máxima verosimilitud. El resultado de la regresión logística se expresa en Odds Ratios (OR), que es el factor por el que se multiplica la posibilidad (odds) de la respuesta Y cuando la variable X se incrementa en una unidad (Carrasco and Hernán, 1993b).

En un estudio transversal, como el que se presenta en esta memoria, los resultados se interpretan como una estimación de la prevalencia. Un valor de OR superior a 1, llamémosle  $n$ , y estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) indica que la probabilidad de que aparezca la respuesta Y es  $n$  veces superior entre los que presentan el factor X que entre los que no lo presentan. Cuando el valor de OR es inferior a 1 y estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), la interpretación es la contraria a la anterior, la probabilidad es  $1/n$  veces inferior.

### **3.16.6. Pruebas no paramétricas**

Las pruebas estadísticas no paramétricas se usaron cuando la muestra fue pequeña ( $< 30$ ) o la distribución de los datos en la población fue libre (los datos no procedían de poblaciones normales y con igualdad de varianzas) (Alvarez, 1995; Armitage and Berry, 1992c).

#### **3.16.6.1. “H” de Kruskal-Wallis**

Análogo no paramétrico del análisis de varianza de un factor. Contrasta si varias muestras independientes proceden de la misma población. Esta prueba estadística compara diferencias a nivel global entre los distintos grupos estudiados. Cuando las diferencias fueron significativas, se utilizó la prueba “U” de Mann-Whitney para comprobar cuáles eran los grupos que diferían significativamente.

#### **3.16.6.2. “U” de Mann-Whitney**

Contrasta si dos muestras de dos subpoblaciones tienen la misma distribución. Las observaciones de ambos grupos se combinan y clasifican con respecto al rango promedio asignado en caso de producirse empates. Si la posición de las poblaciones es idéntica, deberán mezclarse aleatoriamente los rangos en ambas muestras.

#### **3.16.6.3. Análisis de correlación de Spearman (R)**

Variante de coeficiente de correlación de Pearson. Es una medida de asociación que se calcula a partir de la asignación de rangos a los valores ordenados. Dicha asociación será nula si  $R=0$ , aumentando a medida que el valor de  $R$  se aproxima a 1 ó a -1. El signo del coeficiente  $R$  indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo.

#### **3.16.6.4. Curvas de rendimiento diagnóstico (Curvas ROC)**

Las curvas de rendimiento diagnóstico (en inglés, llamadas curvas ROC; “Receiver operating characteristic”) son un buen indicador de la precisión de una prueba diagnóstica. Las curvas ROC se realizaron con el software SPSS (Chicago, Illinois). El área bajo la curva (en inglés, “Area under the curve”; AUC) y los valores de probabilidad se obtuvieron por regresión logística).

Para testar las diferencias entre las AUC de las múltiples curvas ROC, se empleó el método de Hanley y McNeil (Hanley and McNeil, 1982). Los intervalos de confianza (95%) se calcularon a partir de una distribución normal descrita previamente por Galen y Peters. Los valores umbral que maximizaron la eficiencia diagnóstica de la cohorte estudiada se eligieron como puntos de corte óptimos.

Se realizó un análisis Bayesiano para obtener un valor predictivo positivo (VPP), un valor predictivo negativo (VPN), y la eficiencia del cálculo para ambos valores se calculó según las siguientes fórmulas:  $VPP = S(P)/[S(P) + (1 - E)(1 - P)]$  y  $VPN = E(1 - P)/[(1 - S)P + E(1 - P)]$ , donde  $S$  es la sensibilidad,  $E$  es la especificidad y  $P$  es la prevalencia.

### **3.17. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El estudio fue aprobado por los comités éticos del hospital HGUGM y del hospital Clínico San Carlos. Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes para la realización del estudio.



#### **4.    *RESULTADOS***

#### 4.1. ESTUDIO OBSERVACIONAL DE LA COHORTE DE PACIENTES TRATADOS CON METILPREDNISOLONA EN EL BROTE DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Cuarenta pacientes se estudiaron en dos intervalos de tiempo diferentes; durante el brote de EM y tras 5 días de tratamiento con metilprednisolona intravenosa (1 g/día).

Las características clínicas y epidemiológicas de los 40 pacientes con EM se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los pacientes con EM en brote (n=40).

Edad, media en años (rango)	31,5 (18-56)
Duración de la enfermedad, mediana años (rango)	2,8 (0-14)
Número de brotes, mediana (rango)	2,5 (1-8)
EDSS, mediana (rango)	2,6 (1,5-5,5)
Género, cociente mujeres/varones	32/8
Forma clínica RR/CIS	25/15

RR: Remitente-recurrente (Poser et al. 1983). CIS: Síndrome clínico aislado ("Clinically isolated syndrome"). EDSS: Escala de discapacidad ampliada "Expanded Disability Status Scale" (Kurtzke 1983).

##### 4.1.1. Subpoblaciones de células dendríticas y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple en brote y controles sanos

No se observaron diferencias en el porcentaje de las subpoblaciones de CDs durante el brote de EM con respecto a los controles sanos (Tabla 5). El porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados (CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) fue similar en el brote de EM y en los controles. Se observó un mayor porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (p=0,001) durante el brote que en los controles sanos (Tabla 5). El 100% de los T<sub>Reg</sub> coexpresaban la molécula HLA-DR (datos no mostrados). También, en un subgrupo de pacientes en

brote (n=7) y controles (n=7), se confirmó que los T<sub>Reg</sub> coexpresaban mayoritariamente CD45RO, CTLA-4, y CD62L (datos no mostrados).

**Tabla 5.** Porcentajes de subpoblaciones de mCDs y pCDs, linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados (CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, en sangre periférica, durante el brote y a día 5 de MPiv en pacientes con EM y en HC.

	Grupo de pacientes con EM (N.: 40)		$p^*$	Controles (C) (N.: 21)	$p^{**}$
Subpoblaciones celulares	Durante el brote	Tras 5d MPiv			$p$ entre brote y $C$
					$p$ entre 5 d MPiv y $C$
Células dendríticas mieloides					
CD11c <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> HLA- DR <sup>+</sup>	0,87±0,56 0,66 (0,72)	0,41±0,32 0,30 (0,38)	0,000	1,06±0,64 0,96 (0,82)	0,16 0,000
CD1c <sup>+</sup> HLA- DR <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	0,43±0,24 0,37 (0,32)	0,42±0,26 0,36 (0,34)	0,69	0,38±0,40 0,37 (0,28)	0,76 0,88
Células dendríticas plasmacitoides					
CD11c <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> HLA- DR <sup>+</sup>	0,55±0,37 0,46 (0,27)	0,18±0,19 0,12 (0,15)	0,000	0,64 ± 0,54 0,50 (0,33)	0,41 0,000
BDCA-2 <sup>+</sup> HLA- DR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,43±0,27 0,38 (0,36)	0,02±0,02 0,02 (0,02)	0,000	0,46±0,37 0,34 (0,30)	0,99 0,000
Subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup>					
CD4 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> HLA- DR <sup>+</sup>	6,69±4,59 6,79 (8,02)	4,19 ± 3,13 3,13 (3,14 )	0,001	7,86±5,51 7,39 (10,80)	0,66 0,06
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	20,17±7,05 19,88 (11,71)	25,75±8,74 25,56 (11,75)	0,000	16,68±6,70 15,89 (9,16)	0,23 0,001
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high+</sup>	1,47±0,99 1,14 (1,20)	2,62 ± 2,35 2,12 (2,94)	0,000	0,74±0,52 0,53 (0,90)	0,001 0,000

Los datos se expresan como media±DE, mediana (RI). \* Significación entre el brote a los 5-días. Test de Wilcoxon. \*\* Significación entre los pacientes EM y controles. Test U de Mann-Whitney. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartílico.

#### 4.1.2. Efectos *in vivo* de la metilprednisolona intravenosa sobre las subpoblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple

Con respecto a las subpoblaciones de CDs, el tratamiento con MPiv suprimió la proporción de pCDs BDCA-2<sup>+</sup> en un 95%, ( $p < 0,0001$ ) (Fig 9.B), y las mCDs CD11c<sup>+</sup> en un 48%; ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 5, Figura 9.A). No se observó modificación del porcentaje de las mCDs CD1c<sup>+</sup> (BDCA-1<sup>+</sup>) tras tratamiento con MPiv (Tabla 5, Figura 9C). Asimismo, se observó regulación a la baja de la expresión de CD11c en las CDs mieloides. Tras el tratamiento con MPiv, se observó un descenso de la subpoblación CD11c<sup>bright</sup> (de alta intensidad) de un  $89,9 \pm 1,0\%$  del total de las mCDs CD11c<sup>+</sup> a un  $51 \pm 1\%$ . La Figura 10 muestra un paciente representativo, comparando la expresión de CD11c a niveles pre-tratamiento y post-tratamiento con MPiv. La intensidad media de fluorescencia (del inglés, “*Mean Fluorescence Intensity*”; MFI) de la población CD11c<sup>+</sup> descendió de  $374 \pm 14$  a  $191 \pm 28$ . La expresión de HLA-DR también descendió en las mCDs y en las pCDs (Figura 9).

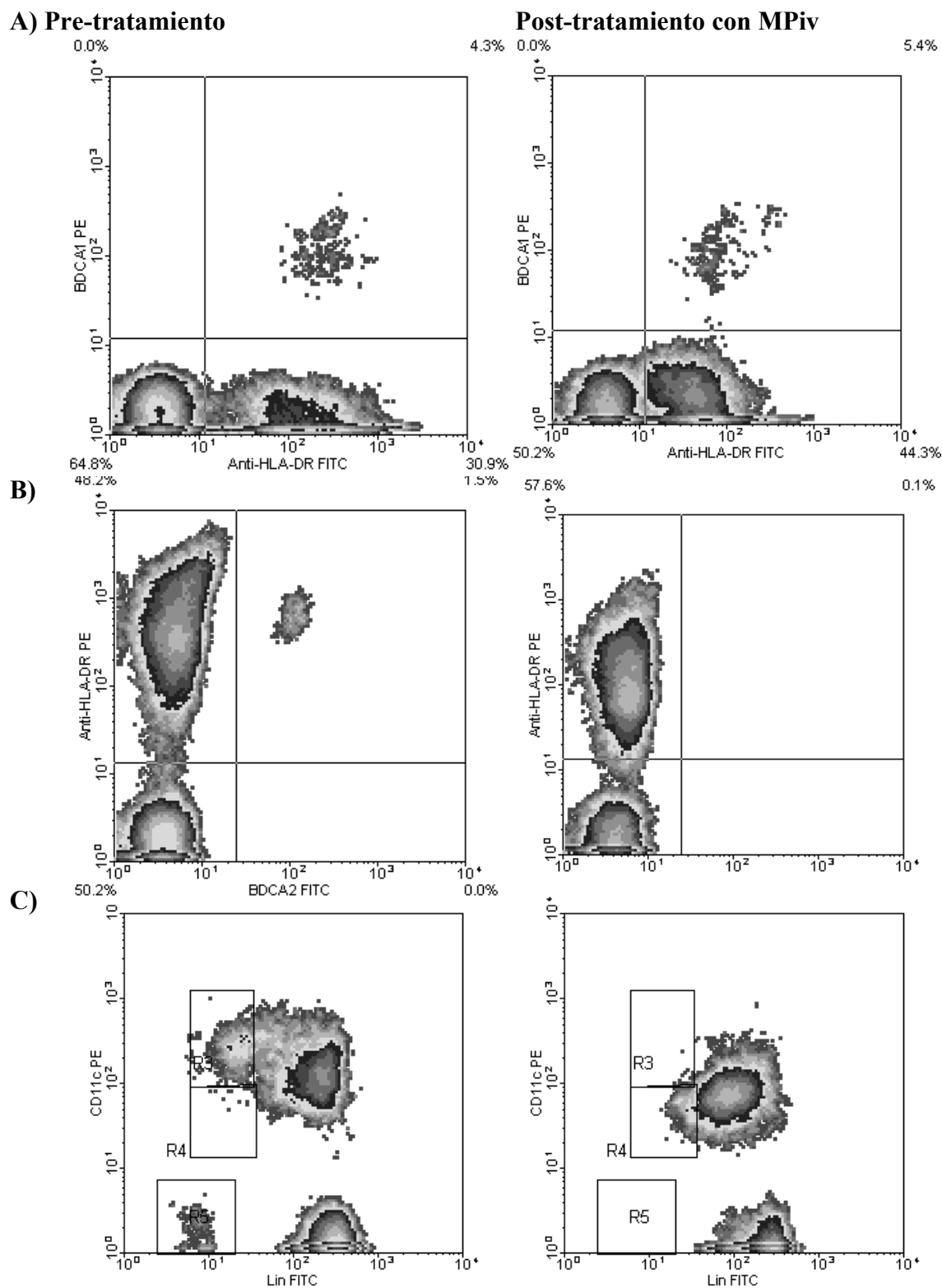
El tratamiento con MPiv suprimió los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados (CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) en un 37% ( $p = 0,001$ ) (Tabla 5, figura 11.A). Se detectó un descenso significativo en la MFI de la expresión HLA-DR en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 11.B). Por el contrario, los linfocitos T<sub>Reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> aumentaron significativamente (22%,  $p < 0,0001$  y 78%,  $p < 0,0001$ , respectivamente) tras el tratamiento con MPiv (Tabla 5, Figura 12).

#### 4.1.3. Correlaciones entre las subpoblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple durante el brote y tras tratamiento con metilprednisolona intravenosa

En los pacientes con EM durante el brote, se encontró correlación inversa entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y las mCDs CD1c<sup>+</sup> y pCDs BDCA2<sup>+</sup> ( $r = -0,39$ ;  $p = 0,01$  y  $r = -0,34$ ;  $p = 0,02$ , respectivamente) y entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> ( $r = -0,39$ ;  $p = 0,01$ ). Se observó correlación directa entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y las mCDs CD1c<sup>+</sup> ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,000$ ). Tras el tratamiento con la MPiv, encontramos correlación inversa entre los linfocitos T

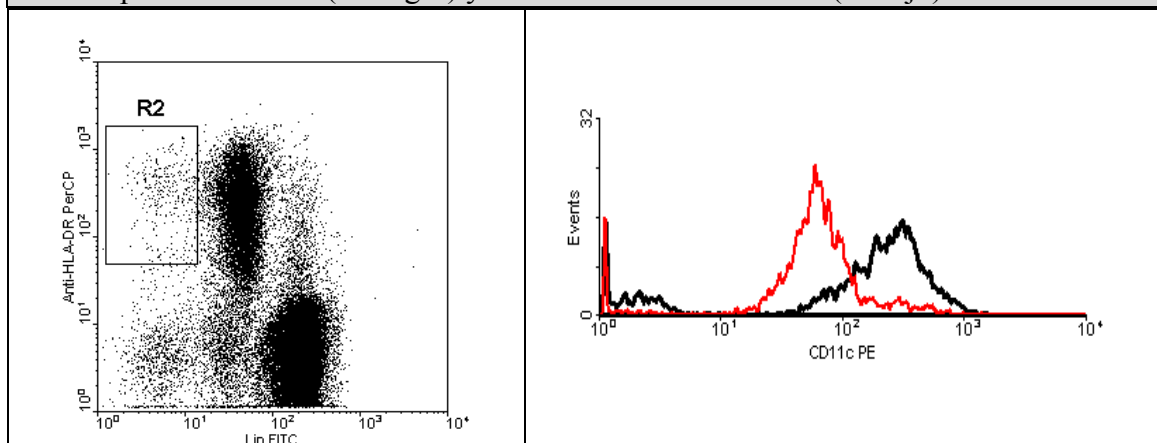
CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y las mCDs CD1c<sup>+</sup> ( $r = -0,33$ ;  $p = 0,03$ ), sin embargo, se perdió la correlación entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y los linfocitos T activados ( $r = 0,13$ ;

**Figura 9.** Imágenes de citometría de flujo que muestran los cambios observados en las subpoblaciones de CDs tras tratamiento con MPiv. No se observó ningún cambio en el porcentaje de las mCDs BDCA1<sup>+</sup> (A). Por el contrario, las pCDs BDCA2<sup>+</sup> (B) y las mCDs CD11c<sup>+</sup> (C) disminuyeron de forma significativa tras tratamiento con MPiv.



$p=0,45$ ). Asimismo, la correlación directa entre linfocitos T  $CD4^+$  activados y las mCDs  $CD1c^+$  se perdió a los 5 días post-MPiv ( $r=-0,17$ ;  $p=0,29$ ). En resumen, estos resultados sugieren que la MPiv descende las pCDs y los linfocitos T activados, mientras que aumenta los linfocitos T  $CD4^+CD25^{+high}$  a corto plazo.

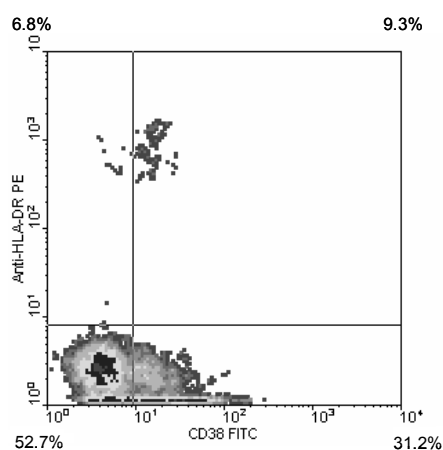
**Figura 10.** Descenso de la expresión *in vivo* de CD11c tras tratamiento con MPiv A) Selección de la región para las células mononucleares  $Lin^-HLA-DR^{bright}$  (células dendríticas totales) para estudiar la expresión de CD11c en un paciente representativo antes y tras el tratamiento con MPiv. B) Histograma que compara la expresión de CD11c pre-tratamiento (en negro) y tras tratamiento con MPiv (en rojo).



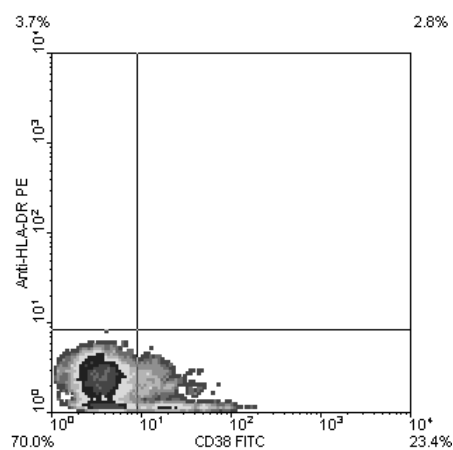
**Figura 11.** Ejemplo representativo de los efectos de la MPiv sobre los linfocitos T  $CD4^+$  activados mostrados por imágenes de citometría de flujo (A) e histogramas (B) pre- y post-tratamiento con MPiv.

### Linfocitos T $CD4^+$ activados

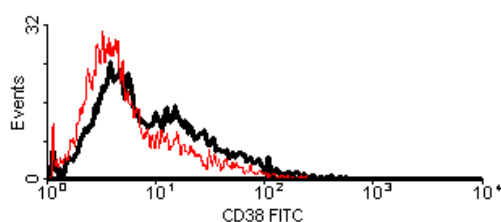
#### A) Pre-tratamiento



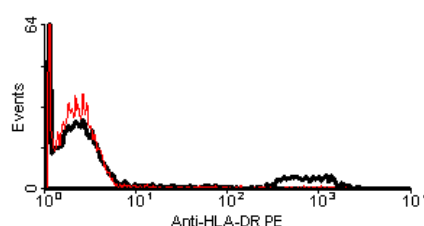
#### Post-tratamiento con MPiv



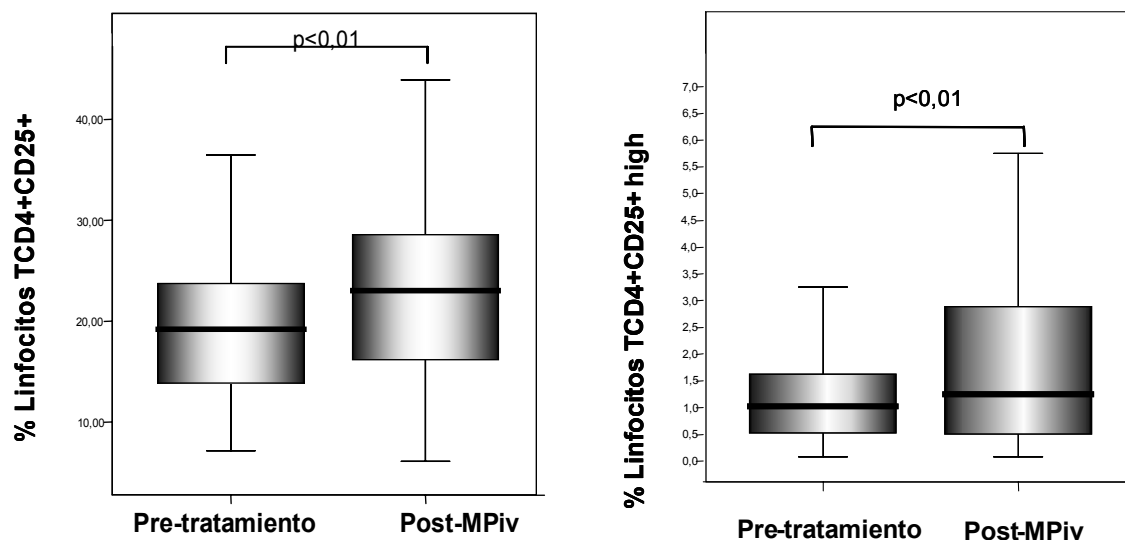
#### B) Pre-tratamiento



#### Post-tratamiento con MPiv



**Figura 12.** Cambios en los linfocitos T reguladores  $CD4^+CD25^+$  y  $CD4^+CD25^{high}$  tras el tratamiento con MPiv en los 40 pacientes con EM. Cada diagrama de caja representa la mediana (línea gruesa) y los percentiles 25 y 75. Las barras de error representan los valores más altos y más bajos que están fuera de rango (○, \*).



#### 4.1.4. Subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+$ (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T $CD8^+$ (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple en brote y controles sanos

La única diferencia significativa encontrada en las subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$  estudiadas entre los pacientes en brote con respecto a los controles sanos fueron los linfocitos T  $CD8^+CD25^+CD28^-$ . Estas células se encontraban en menor porcentaje en los pacientes ( $0,14 \pm 0,17\%$  frente a  $0,44 \pm 0,60\%$ , respectivamente) (Tabla 6).

#### 4.1.5. Efectos *in vivo* de la metilprednisolona intravenosa sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8<sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple

El tratamiento con MPiv no indujo ningún cambio significativo en la distribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes, memoria central y memoria efectores.

**Tabla 6.** Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> periféricos (activados, reguladores, vírgenes y memoria efectores) durante el brote y a día 5 post-tratamiento con MPiv en pacientes con EM y en controles sanos.

	Pacientes EM (N:20)		<i>p</i> *	Controles (C) (N:18)	<i>p</i> **
Linfocitos T CD8 <sup>+</sup>	Basal	Día 5 post-MPiv			<i>p entre basal y C</i>
					<i>p entre día 5 y C</i>
CD8 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	9,35±8,96 5,41 (11,61)	6,31±5,25 4,80 (3,77)	<b>0,05</b>	7,85±11,85 3,53 (3,17)	NS NS
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	2,19±2,38 1,49 (2,10)	4,33±3,71 3,48 (4,18)	<b>0,002</b>	2,12±2,57 1,17 (0,43)	NS <b>0,01</b>
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,14±0,17 0,08 (0,23)	0,44±0,60 0,26 (0,27)	NS	0,53±0,61 0,22 (0,91)	<b>0,02</b> NS
CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	14,11±8,30 11,80 (10,06)	11,60±7,38 11,90 (12,07)	0,07	15,07±10,92 12,14 (10,70)	NS NS
CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup>	43,04±19,55 46,01 (31,71)	48,28±22,73 57,67 (41,83)	0,07	47,51±16,64 45,42 (29,88)	NS NS

Los datos se expresan como media±DE, mediana (RI). \*Significación estadística entre el brote a los 5-días. Test de Wilcoxon. \*\*Significación estadística entre los pacientes EM y controles. Test U de Mann-Whitney. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartílico.

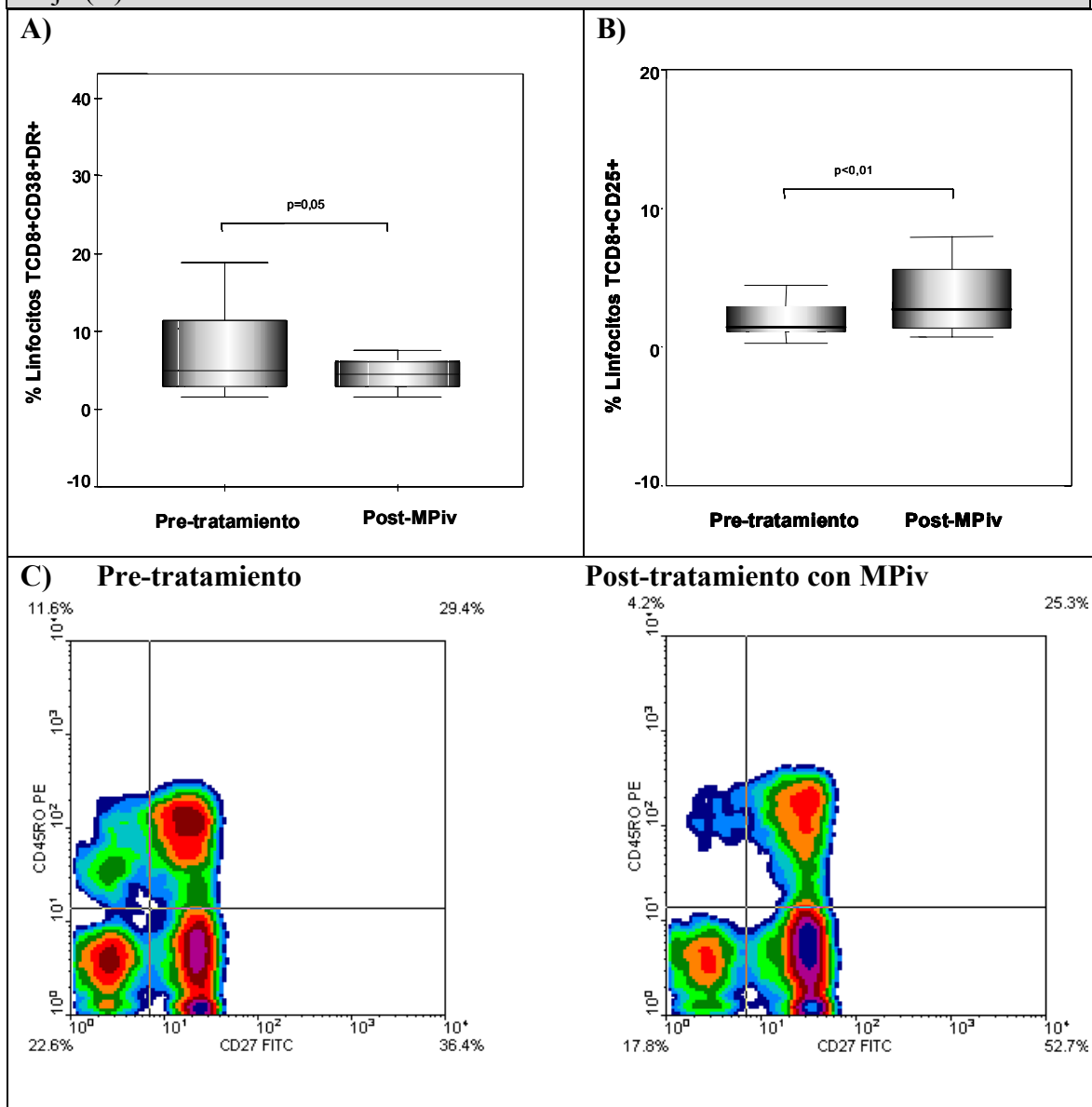
Sin embargo, se observó un descenso del porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados (CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, *p*=0,05) y una tendencia a la disminución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> memoria efectores (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, *p*=0,07). Además, se observó un aumento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>, *p*=0,07) y CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (*p*<0,002) (Tabla 6, Figura 13).



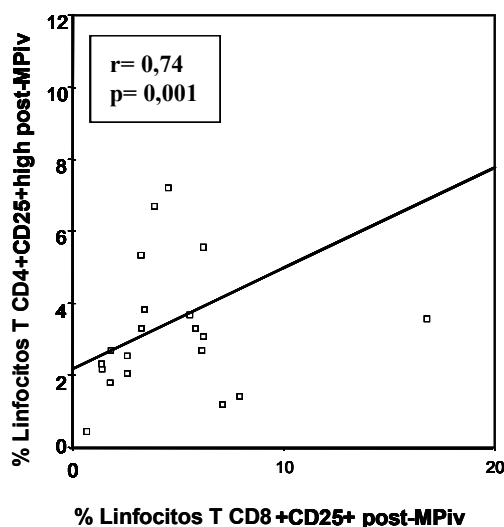
#### 4.1.6. Correlaciones entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> durante el brote y tras el tratamiento con metilprednisolona intravenosa

Durante el brote, se encontró correlación inversa entre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados ( $r = -0,6$ ;  $p = 0,01$ ).

**Figura 13.** Cambios en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados (A) y linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores (B), tras el tratamiento con MPiv, mostrados en diagramas de caja. Un ejemplo representativo del descenso observado en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> memoria efectores (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) y el aumento porcentual en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>) tras tratamiento con MPiv. Imagen de citometría de flujo (C).



**Figura 14.** Tras 5 días del tratamiento con MPiv se observó una correlación directa entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> reguladores ( $r=0,74$ ;  $p < 0,001$ ).

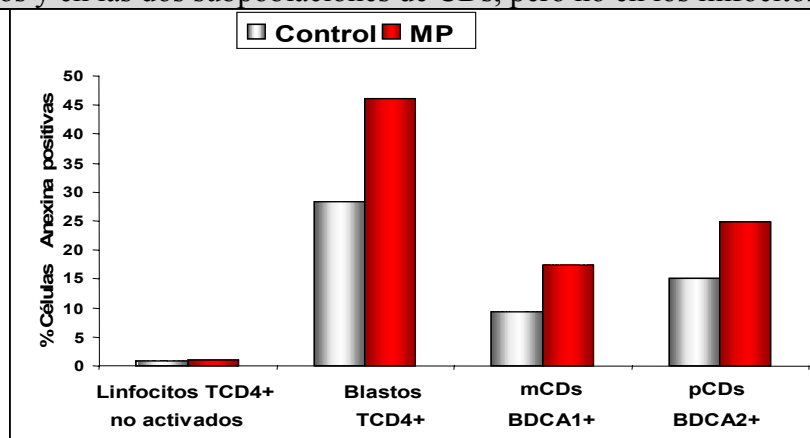


Tras la MPiv se observó correlación directa entre los linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>,  $r=0,74$ ;  $p<0,0001$ ) (Figura 14). Sin embargo, se encontró correlación inversa entre los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> y los activados. (CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>,  $r=-0,53$ ,  $p=0,03$ ).

#### 4.1.7. Efectos *in vitro* de la metilprednisolona sobre las subpoblaciones de células dendríticas (mCDs y pCDs) y linfocitos T activados y en reposo

Como se observa en la Figura 15, los experimentos *in vitro* ( $n=3$ ) mostraron que se incrementó la apoptosis (aumento del porcentaje de células Anexina<sup>+</sup>) en los linfocitos T activados (mediana;  $47 \pm 7,57$  frente a  $27 \pm 4,93$  en los puntos control), en las mCDs (mediana;  $17 \pm 8,53$  frente a  $10 \pm 5,03$  en el control) y en las pCDs (mediana;  $25 \pm 7,38$  frente a  $17 \pm 4,49$  en el control) tras 24 horas de cultivo con MP, no ocurriendo así en los linfocitos T en reposo (no activados). Se muestra un ejemplo representativo.

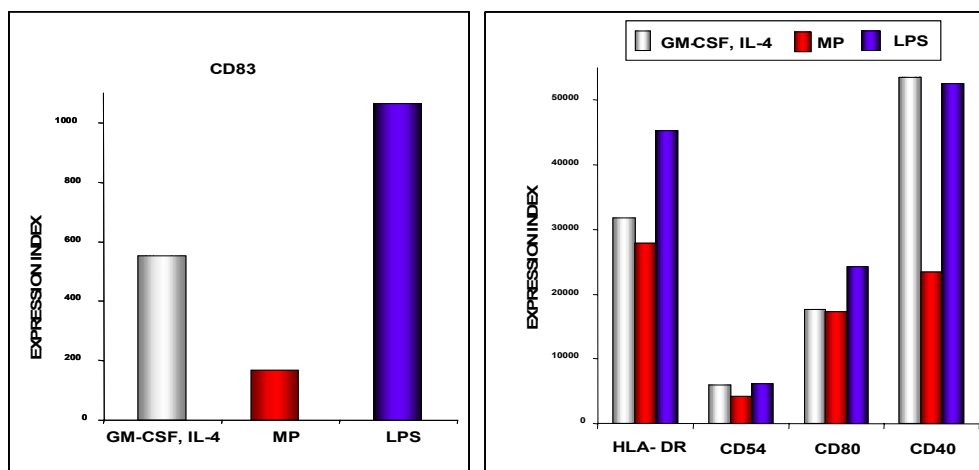
**Figura 15.** El tratamiento *in vitro* con MP incrementó la apoptosis en los linfocitos T activados y en las dos subpoblaciones de CDs, pero no en los linfocitos T no activados.



#### 4.1.8. Efectos *in vitro* de la metilprednisolona sobre la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos

Como se puede observar en el ejemplo de la Figura 16, el tratamiento con MP en los cultivos de CDs derivadas de monocitos, inhibió la expresión del marcador de maduración CD83 (Índice de expresión:  $175 \pm 21,58$ , en los cultivos tratados con MP frente a  $740 \pm 123,68$ , en los cultivos sin tratar) y de la molécula coestimuladora CD40 (Índice de expresión:  $22340 \pm 401,50$  en los cultivos tratados con MP frente a  $52500 \pm 710$  en los cultivos sin tratar), sin afectar a la expresión de HLA-DR o a la molécula de adhesión CD54. Por el contrario, el tratamiento con LPS indujo la maduración de las CDs derivadas de monocitos, al observarse un aumento en la expresión del marcador CD83 (Índice de expresión:  $1150 \pm 210$  en los cultivos tratados con LPS frente a  $740 \pm 123,68$ , en los cultivos sin tratar) y de CD80 y HLA-DR.

**Figura 16.** El tratamiento con MP *in vitro* inhibió la maduración de las CDs y la expresión de CD40.



Los datos se expresan como índice de expresión ("Expression Index"; EI): % de células positivas x Intensidad media de fluorescencia ("Mean Fluorescence Intensity"; MFI) del marcador.

#### 4.2. ESTUDIO OBSERVACIONAL LONGITUDINAL DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON EMRR EN REMISION EN LOS QUE SE INICIA TRATAMIENTO CON INTERFERÓN BETA-1a

Los pacientes se analizaron en el estudio basal (antes de iniciar tratamiento con IFN $\beta$ -1a) y a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a. Se dividió a los pacientes en dos grupos según la respuesta clínica al IFN $\beta$ -1a tras 1 año de seguimiento: Pacientes respondedores al tratamiento (libres de brotes o que no hubiesen aumentado la EDSS a

lo largo del estudio) y pacientes no respondedores al tratamiento (que hubiesen tenido algún brote o aumentado la EDSS a lo largo del estudio) (Rio et al., 2006). Las características clínicas y demográficas de los 23 pacientes con EM y los 26 controles, están descritas en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Características clínicas y demográficas de los 23 pacientes antes y durante el tratamiento con IFN $\beta$ -1a y de los 26 controles sanos

	<b>Pacientes EM</b>	<b>Respondedores</b>	<b>No respondedores</b>	<b>Controles sanos</b>
<b>Número de pacientes</b>	23	14	9	26
<b>Género (varón:mujer) (n)</b>	10:13	6:8	6:3	13:13
<b>Edad en el estudio basal</b>	36,52 $\pm$ 8,00	35,50 $\pm$ 6,82	38,11 $\pm$ 9,79	34,5 $\pm$ 6,30
<b>Duración de EM en el estudio basal</b>	4,10 $\pm$ 3,35	3,85 $\pm$ 3,64	4,50 $\pm$ 3,02	
<b>EDSS basal</b>	1,89 $\pm$ 1,23	1,71 $\pm$ 1,09	2,17 $\pm$ 1,46	
<b>EDSS tras 1 año de IFN<math>\beta</math>-1a</b>	2,05 $\pm$ 1,49	1,75 $\pm$ 1,06	2,44 $\pm$ 1,93	
<b>Tasa de brotes en los 2 años previos al IFN<math>\beta</math>-1a</b>	1,94 $\pm$ 1,34	1,90 $\pm$ 0,74	2,00 $\pm$ 2,00	
<b>Tasa de brotes durante 1 año previo al IFN<math>\beta</math>-1a</b>	1,78 $\pm$ 0,85	1,50 $\pm$ 0,76	2,22 $\pm$ 0,83	
<b>Tasa de brotes durante el año con IFN<math>\beta</math>-1a</b>	0,43 $\pm$ 0,59	0,00 $\pm$ 0,00	1,11 $\pm$ 0,33	

Los datos se expresan como media $\pm$ DE, en años. EDSS: Escala de discapacidad ampliada de Kurtzke (Kurtzke's 1983). Tasa de brotes = Número de brotes/años/número de pacientes. DE: desviación estándar.

A los 12 meses de tratamiento con Rebif 44, 14 de los 23 pacientes (60,87%) permanecieron libres de brotes y sin progresión en la discapacidad, (respondedores), similar al 56,3% reportado previamente por otros estudios. Nueve pacientes (39,13%) no respondieron al tratamiento. Estos datos son compatibles con otros ensayos clínicos (Panitch et al., 2005) en los que a los 16 meses de tratamiento con Rebif tiw el 56,3% de los pacientes permaneció libre de brotes. Los 9 no respondedores presentaron algún brote durante el seguimiento. Dos pacientes de los 9 no respondedores (8,6%)

progresaron en la escala EDSS durante el primer año de tratamiento; uno como secuela del brote y el otro debido a la progresión a la forma EMSP a los 6 meses del tratamiento.

Los pacientes no respondedores mostraron una mayor proporción de hombres (Tabla 7) y mayor edad que los respondedores, aunque no se encontraron diferencias significativas, probablemente debido al bajo número de pacientes.

#### **4.2.1. Subpoblaciones de células dendríticas y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos**

Al comparar los pacientes con EM en el estudio basal con respecto a los controles sanos se observó que los porcentajes de mCDs (BDCA-1<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> y CD11c<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) fueron significativamente más bajos en los pacientes con EM ( $p=0,02$  y  $p<0,01$ , respectivamente) (Tabla 8). También los porcentajes de linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+high</sup> tendieron a ser mayores en los pacientes con EM ( $p=0,08$ ) que en los controles sanos, según se muestra en la Tabla 8.

##### **4.2.1.1. Subpoblaciones de células dendríticas y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en respondedores y no respondedores**

Cuando se compararon los niveles basales de poblaciones de CDs y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los pacientes con EM respondedores y no respondedores al tratamiento con respecto a los controles sanos se observó que los no respondedores presentaron menor porcentaje de mCDs BDCA1<sup>+</sup> que los respondedores y que los controles sanos (0,01 frente a 0,04, respectivamente, Figura 17). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje basal de pCDs entre pacientes respondedores y no respondedores. También se encontró que los porcentajes de linfocitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+high</sup>) eran significativamente mayores en los pacientes respondedores con respecto a los controles sanos (0,04 y 0,01, respectivamente), pero no en los no respondedores (Tabla 9).

#### 4.2.2. Efectos *in vivo* del Interferón beta-1a sobre las subpoblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple

Al año de tratamiento con IFNβ-1a, se produjo un incremento de las mCDs BDCA1<sup>+</sup>, desapareciendo diferencias significativas con respecto a los controles sanos (Tablas 8 y 9, Figura 17) y aunque las mCDs CD11c<sup>+</sup> también aumentaron, siguieron manteniéndose más bajas que en los controles (p=0.00). Sin embargo, se observó un

**Tabla 8.** Porcentajes de subpoblaciones periféricas de CDs (mCDs y pCDs), linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados (CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> en pacientes con EM en el estudio basal y tras un año de tratamiento con IFNβ-1a y en controles sanos.

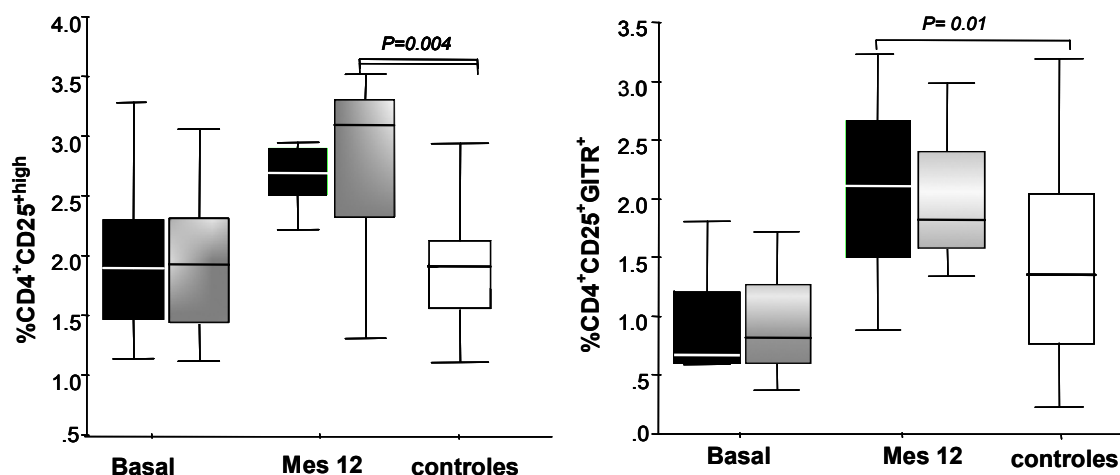
	Grupo de pacientes EM (N: 23)		<i>p</i> *	Controles (C) (N: 26)	<i>p</i> **
Subpoblaciones de CDs	Basal	12-meses post-IFNβ- 1a			<i>p</i> entre basal y C
					<i>p</i> entre 12 meses y C
Células dendríticas mieloides					
BDCA-1 <sup>+</sup> HLA- DR <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	0,53±0,55 0,43 (0,19)	0,63±0,29 0,60 (0,43)	NS	0,61±0,27 0,56 (0,37)	<b>0,02</b> NS
CD11c <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> HLA- DR <sup>+</sup>	0,44 ± 0,23 0,37 (0,32)	0,42±0,17 0,45 (0,29)	NS	0,71±0,37 0,64 (0,43)	<b>0,00</b> <b>0,00</b>
Células dendríticas plasmacitoides					
BDCA-2 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	0,36±0,25 0,34 (0,23)	0,34±0,13 0,32 (0,24)	NS	0,38±0,17 0,34 0,22)	NS NS
CD11c <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> HLA- DR <sup>+</sup>	0,46±0,19 0,42 (0,33)	0,44±0,16 0,45 (0,33)	NS	0,49±0,14 0,52 (0,39)	NS NS
Lin <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup> HLA- DR <sup>+</sup>	0,42±0,22 0,37 (0,26)	0,32±0,12 0,32 (0,21)	NS	0,40±0,19 0,35 (0,29)	NS <b>0,04</b>
Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>					
CD4 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> HLA- DR <sup>+</sup>	3,77±2,55 2,95 (2,21)	4,82± 3,18 3,97 (2,95)	NS	4,91±3,30 3,48 (2,83)	NS NS
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	16,43±5,79 16,10 (11,32)	22,93±3,69 22,28 (20,66)	<b>0,00</b>	15,74±4,90 13,72 (12,13)	NS <b>0,00</b>
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+high</sup>	1,93±0,56 1,91 (1,44)	2,74±0,67 2,90 (2,34)	<b>0,00</b>	1,62±0,91 1,64 (1,00)	0,08 <b>0,00</b>
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> GITR <sup>+</sup>	1,22±0,87 0,88 (0,59)	2,02±0,77 1,99 (1,39)	<b>0,05</b>	1,41±0,86 1,37 (0,73)	NS <b>0,02</b>

Los datos se expresan como media+desviación estándar (DE), mediana (rango intercuartílico, RI). \*Significación estadística entre el basal y 12-meses. Test de Wilcoxon. \*\* Significación estadística entre los pacientes EM y los controles. Test U de Mann-Whitney.

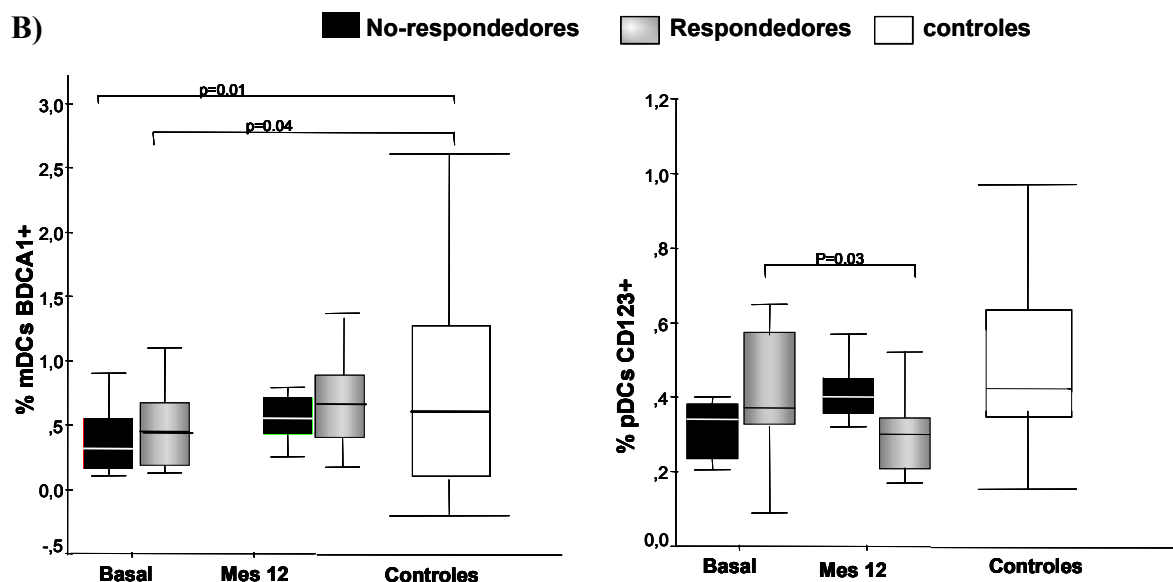
descenso en el porcentaje de pCDs  $CD123^+$  desde el mes 3 de tratamiento, manteniéndose el descenso durante el primer año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a ( $p=0,04$ ) (Tablas 8 y 9, Figura 18). Los linfocitos T reguladores ( $CD4^+CD25^+$  y  $CD4^+CD25^{high}$ ) aumentaron progresivamente durante el tratamiento con IFN $\beta$ -1a ( $p<0,01$  y  $p<0,01$ , respectivamente, Tablas 8 y 9, Figuras 17 y 18). También se observó un progresivo aumento del porcentaje de los linfocitos T  $CD4^+CD25^+GITR^+$  ( $p=0,05$ ) (Tabla 8, Figura 17).

**Figura 17.** Modificaciones en el porcentaje de linfocitos  $T_{Reg}$  durante el primer año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a en ambos grupos de pacientes EM (respondedores y no-respondedores) comparados con controles sanos. A) Los diagramas de caja muestran el porcentaje de linfocitos T reguladores ( $CD4^+CD25^{high}$  y  $CD4^+CD25^+GITR^+$ ) en el grupo de estudio basal y a los 12 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a y en el grupo control. Cada caja representa la mediana (línea gruesa) y los percentiles 25 y 75. Las barras de error representan los valores más bajos y más altos alcanzados. B) Los diagramas de caja muestran las células dendríticas mieloides y plasmacitoides en los grupos del estudio basal y a los 12 meses con respecto al grupo control.

A)



B)



Todas estas subpoblaciones de linfocitos T reguladores fueron significativamente mayores en los pacientes tras 1 año de tratamiento que en los controles sanos ( $p=0,00$ ,  $p=0,00$  y  $p=0,02$ ) (Tabla 8). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados no mostraron variaciones a lo largo del tratamiento.

#### **4.2.2.1. Efectos *in vivo* del Interferón beta-1a sobre las subpoblaciones de células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y reguladores de sangre periférica en pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento**

Al comparar pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento a lo largo del seguimiento, los respondedores mostraron un mayor aumento en el porcentaje de mCDs BDCA1<sup>+</sup> y en el porcentaje de linfocitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) tras el primer año de tratamiento ( $p=0,00$  y  $p=0,00$ , respectivamente) (Tabla 10).

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de pCDs basal entre ambos grupos. Sin embargo, las pCDs CD123<sup>+</sup> descendieron significativamente en los respondedores ( $p=0,03$ ), no siendo así en los no respondedores (Tabla 10).

**En resumen**, estos resultados concluyen que tras el primer año de tratamiento IFNβ-1a aumentan los porcentajes de mCDs y todas las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores, mientras que descienden las pCDs CD123<sup>+</sup> en los pacientes con EM, siendo este descenso significativo únicamente en los pacientes respondedores.



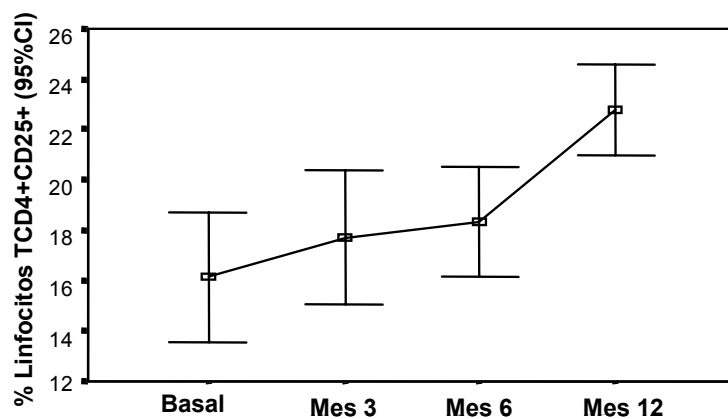
**Tabla 9.** Estudio longitudinal de los porcentajes de subpoblaciones circulantes de CDs (mCDs y pCDs), linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y reguladores en los 23 pacientes con EM en basal, a mes 3, mes 6 y a 1 año de tratamiento con IFNβ-1a y en los controles.

	Pacientes con EM (No.: 23)				Controles (N: 26)
	Basal	Mes 3 post-IFNβ-1a	Mes 6 post-IFNβ-1a	Mes 12 post-IFNβ-1a	
<b>BDCA-1<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> mCDs<sup>-</sup></b>	0,53±0,55 0,43 (0,19)	0,56±0,46 0,41 (0,22)	0,73±0,62 0,59 (0,43)	0,63±0,29 0,60 (0,43)	*0,61±0,27 0,56 (0,37)
<b>CD11c<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> mCDs</b>	0,44 ± 0,23 0,37 (0,32)	0,38±0,22 0,32 (0,26)	0,39±0,18 0,36 (0,26)	0,42±0,17 0,45 (0,29)	**0,71±0,37 0,64 (0,43) p=0,00 vs. M12
<b>BDCA-2<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> pCDs</b>	0,36±0,25 0,34 (0,23)	0,34±0,16 0,32 (0,21)	0,28±0,14 0,27 (0,18)	0,34±0,13 0,32 (0,24)	0,38±0,17 0,34 (0,22)
<b>CD11c<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> pCDs</b>	0,46±0,19 0,42 (0,33)	0,48±0,28 0,39 (0,32)	0,39±0,12 0,39 (0,32)	0,44±0,16 0,45 (0,33)	0,49±0,14 0,52 (0,39)
<b>Lin<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> pCDs</b>	0,42±0,22 0,37 (0,26)	0,33±0,14 0,29 (0,21)	0,31±0,09 0,28 (0,23)	0,32±0,12 0,32 (0,21)	<sup>δ</sup> 0,40±0,19 0,35 (0,29)
<b>CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Activados</b>	3,77±2,55 2,95 (2,21)	4,83±2,62 4,36 (3,17)	3,94±1,54 4,07 (2,77)	4,82±3,18 3,97 (2,95)	4,91±3,30 3,48 (2,83)
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub></b>	16,43±5,79 16,10 (11,32)	18,08±5,81 16,05 (13,36)	18,80±4,77 18,64 (16,47)	** <sup>¥¥</sup> 22,93±3,69 22,28 (20,66)	<sup>¥¥</sup> <sup>δδ</sup> 15,74±4,90 13,72 (12,13)
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T<sub>Reg</sub></b>	1,93±0,56 1,91 (1,44)	2,26±0,92 2,18 (1,40)	2,21±0,64 2,18 (1,59)	** <sup>¥</sup> 2,74±0,67 2,90 (2,34)	<sup>§</sup> <sup>¥¥</sup> <sup>δδ</sup> 1,62±0,91 1,64 (1,00)
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub></b>	1,22±0,87 0,88 (0,59)	1,32±0,72 1,13 (0,86)	<sup>§</sup> 1,69±0,82 1,45 (1,09)	*2,02±0,77 1,99 (1,39)	<sup>δ</sup> 1,41±0,86 1,37 (0,73)

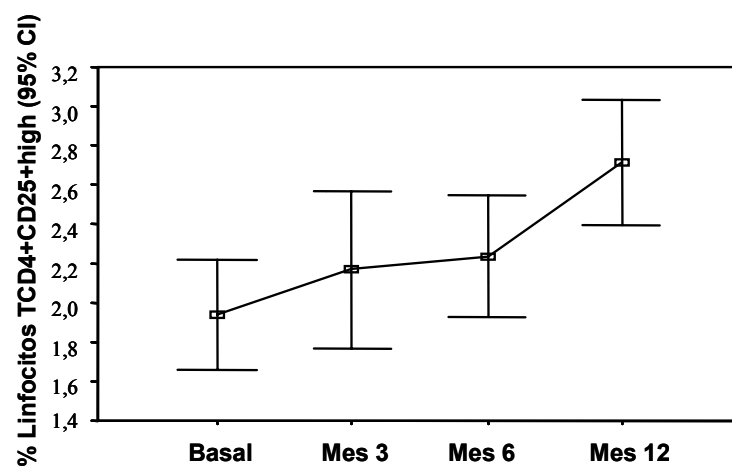
Los datos se expresan como media±DE, mediana (RI). DS: Desviación estándar. RI: Rango intercuartílico.\*p<0,05 con el basal, \*\*p<0,01 con el basal, <sup>§</sup>p<0,05 con M3, <sup>¥</sup>p<0,05 con M6, <sup>¥¥</sup>p<0,01 con M6, <sup>δ</sup>p<0,05 con M12, <sup>δδ</sup>p<0,01 con M12. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartílico.

**Figura 18.** Modificaciones en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores (A y B) y las células dendríticas plasmacitoides CD123<sup>+</sup> (C) a lo largo de los 12 meses de seguimiento. (N=23 pacientes).

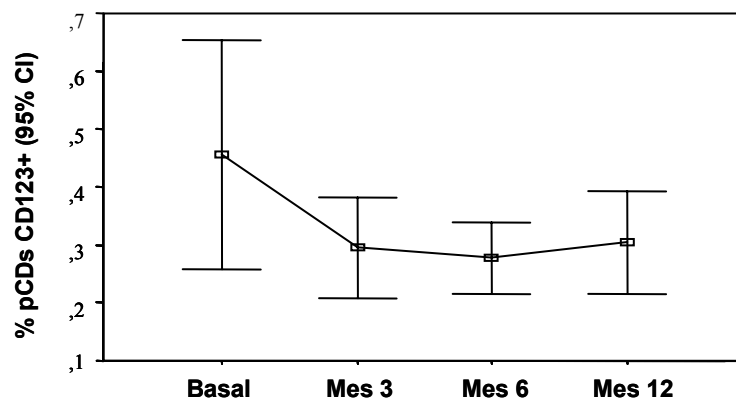
A)



B)



C)



**Tabla 10.** Porcentajes de subpoblaciones de CDs periféricas (mDCs y pDCs), linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados (CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) y reguladores en pacientes con EM, respondedores y no respondedores, basal y tras 1 año de tratamiento con IFNβ-1a y en los controles.

	Pacientes EM respondedores (N: 14)		<i>p</i> *	Pacientes EM no-respondedores (N: 9)		<i>p</i> *	controles (N: 26)	<i>p</i> <sup>**1</sup> (respondedores)	<i>p</i> <sup>**2</sup> (no-respondedores)
	Basal	12-meses IFNβ		Basal	12-meses IFNβ			<i>p</i> entre basal y controles <i>p</i> entre 12-meses y controles	<i>p</i> entre basal y controles <i>p</i> entre 12-meses controles
<b>Células dendríticas</b>									
<b>BDCA-1<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup></b>	0,63±0,68 0,45 (0,19)	0,67±0,34 0,66 (0,41)	NS	0,39±0,25 0,40 (0,16)	0,55±0,18 0,56 (0,43)	NS	0,61±0,27 0,56 (0,37)	<b>0,04</b> NS	<b>0,01</b> NS
<b>CD11c<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup></b>	0,45±0,29 0,38 (0,31)	0,43±0,21 0,47 (0,23)	NS	0,42±0,15 0,35 (0,29)	0,45±0,16 0,46 (0,33)	NS	0,71±0,37 0,64 (0,43)	<b>0,005</b> <b>0,003</b>	<b>0,008</b> <b>0,02</b>
<b>BDCA-2<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup></b>	0,39±0,30 0,35 (0,19)	0,33±0,13 0,31 (0,24)	NS	0,31±0,73 0,31 (0,24)	0,36±0,14 0,39 (0,25)	NS	0,38±0,17 0,34 (0,22)	NS NS	NS NS
<b>CD11c<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup></b>	0,46±0,17 0,43 (0,36)	0,40 ± 0,15 0,39 (0,28)	NS	0,46±0,22 0,39 (0,29)	0,51±0,15 0,49 (0,39)	NS	0,49±0,14 0,52 (0,39)	NS NS	NS NS
<b>Lin<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup></b>	0,36±0,16 0,35 (0,22)	0,29±0,10 0,30 (0,21)	<b>0,03</b>	0,36±0,16 0,35(0,22)	0,36±0,15 0,39 (0,22)	NS	0,40±0,19 0,35 (0,29)	NS NS	NS NS
<b>Linfocitos T CD4<sup>+</sup></b>									
<b>CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup></b>	4,08±2,81 3,23 (2,52)	5,31±3,72 4,17 (2,95)	NS	3,29±2,15 2,56 (1,68)	4,21±1,79 4,02 (3,10)	NS	4,91±3,30 3,48 (2,83)	NS NS	NS NS
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	16,34±6,27 17,03 (10,98)	23,04±4,51 22,28 (19,74)	<b>0,008</b>	16,57±5,35 15,22 (13,06)	22,72±1,73 22,25 (21,26)	<b>0,01</b>	15,74±4,90 13,72 (12,13)	<b>0,04</b> <b>0,001</b>	NS <b>0,01</b>
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>high</b>	1,93±0,54 1,93 (1,43)	2,74±0,80 3,09 (2,11)	<b>0,002</b>	1,94±0,64 1,75 (1,47)	2,75±0,39 2,69 (2,50)	<b>0,02</b>	1,62±0,91 1,64 (1,00)	<b>0,01</b> <b>0,004</b>	NS 0,09
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup></b>	1,38±1,01 0,93 (0,59)	1,99±0,82 1,99 (1,27)	NS	0,97±0,69 0,82(0,37)	2,07±0,79 2,14(1,34)	NS	1,41±0,86 1,37 (0,73)	NS <b>0,09</b>	NS <b>0,01</b>

Los datos se expresan como media±DE, mediana (RI). \* Significación estadística entre el basal y los 12 meses. Test de Wilcoxon. \*\* Significación estadística entre pacientes y controles. <sup>\*\*1</sup> Significación estadística entre respondedores y controles. <sup>\*\*2</sup> Significación estadística entre no respondedores y controles. Test U de Mann-Whitney. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartílico.

### **4.2.3. Subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8<sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos.**

En los pacientes con EM en el estudio basal, los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales fueron de 1,76% para los CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y de 0,22% para los CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (p=0,02), siendo ambos menores que en los controles sanos. Sin embargo, los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria central fueron mayores en los pacientes EM que en los controles (29,16±15,63 frente a 12,23±6,34) (p=0,005). No se encontraron diferencias en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> memoria-efectores, ni efectores (Tabla 11).

#### **4.2.3.1. Subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8<sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en respondedores y no respondedores**

Al comparar pacientes respondedores y no respondedores con respecto a los controles, se observó que los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>), eran mucho más bajos en los no respondedores. (1,19±0,59 frente a 2,23±0,5, p= 0,09 y 0,18±0,24 frente a 0,25±0,50, p=0,02, respectivamente) (Tabla 12).

### **4.2.4. Efectos *in vivo* del Interferón beta-1a sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y T CD8<sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple**

De forma similar a las modificaciones de los porcentajes de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) aumentaron significativamente al año de tratamiento con IFN-β1a (p=0,007 y p=0,03, respectivamente), desapareciendo las diferencias significativas encontradas en el estudio basal con respecto a los controles sanos (Tablas 11 y 12, Figura 19). Por el contrario, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria central (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) descendieron

significativamente al año de tratamiento ( $p=0,004$ ). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> memoria efectores descendieron significativamente al tercer mes de tratamiento ( $p=0,04$ ) y permanecieron en niveles bajos durante el seguimiento. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>TCR<sup>γδ</sup><sup>+</sup> presentaban porcentajes más elevados en los pacientes con EM en el estudio basal con respecto a los controles y descendieron al año de tratamiento con interferón beta ( $1,61\pm 1,19$  en basal frente a  $1,22\pm 1,64$  a mes 12 de tratamiento) (Tablas 11 y 12).

**Tabla 11.** Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (vírgenes, memoria central, memoria efectores) y T CD8<sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores, efectores y CD8<sup>+</sup>TCR<sup>γδ</sup><sup>+</sup>) en pacientes con EM basal y tras 12-meses de tratamiento con IFNβ-1a y en controles sanos.

	Grupo de pacientes EM (N: 23)		<i>p</i> *	Controles (C) (N.: 26)	<i>p</i> **
	Basal	12-meses post- tratamiento IFNβ-1a			<i>p</i> entre basal y C
					<i>p</i> entre mes 12 y C
<b>Linfocitos T CD4<sup>+</sup></b>					
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> vírgenes	46,24±13,69 43,20 (27,20)	40,21±10,46 39,83 (35,24)	NS	42,41±14,65 43,04 (36,87)	NS NS
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> Memoria central	48,14±11,66 44,01 (43,07)	46,35±11,13 46,33 (35,27)	NS	40,19±12,23 42,67 (37,49)	NS NS
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> Memoria efectores	9,21±3,34 8,58 (6,87)	13,43±6,17 12,17 (9,88)	NS	15,03±6,68 13,19 (10,82)	NS NS
<b>Linfocitos T CD8<sup>+</sup></b>					
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	1,76±0,75 2,04 (0,87)	5,88±4,87 3,89 (2,32)	<b>0,007</b>	3,67±2,49 3,10 (1,81)	0,09 NS
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,22±0,40 0,05 (0,02)	1,05±2,04 0,48 (0,24)	<b>0,03</b>	0,50±0,39 0,38 (0,18)	0,02 NS
CD8 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> HLADR <sup>+</sup> Activados	7,74±5,19 8,35 (4,46)	17,68±11,89 13,08 (8,66)	<b>0,01</b>	6,26±5,43 4,88 (2,35)	NS <b>0,002</b>
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> vírgenes	38,36±19,53 34,22 (23,10)	32,15±10,97 29,56 (25,26)	NS	22,19±12,81 21,31 (13,15)	NS NS
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> Memoria central	29,16±15,63 28,88 (14,76)	15,30±6,93 12,89 (8,88)	<b>0,004</b>	12,23±6,34 11,01 (6,65)	NS NS
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> Memoria efectores	31,96±12,87 32,50 (23,29)	28,97±13,37 27,39 (17,20)	NS	37,51±14,06 37,23 (26,11)	NS NS
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> Efectores	26,97±10,15 25,31 (16,54)	26,72±12,36 25,31 (16,54)	NS	27,26±11,45 24,18 (19,72)	NS NS
CD8 <sup>+</sup> TCR <sup>γδ</sup> <sup>+</sup>	1,61±1,19 1,23 (0,57)	1,22±1,64 0,61 (0,24)	NS	1,35±0,62 1,12 (0,80)	NS NS

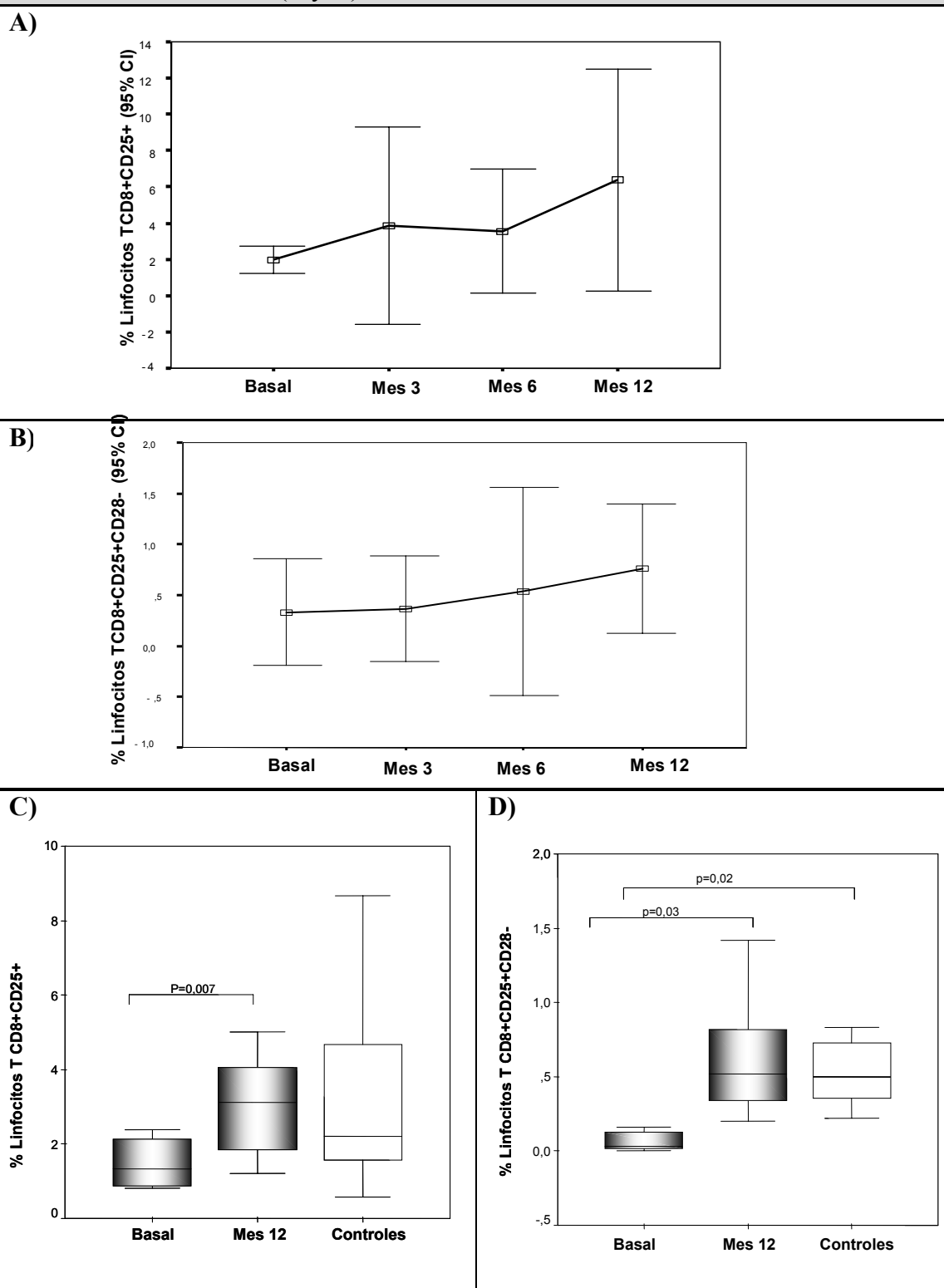
Los datos se expresan como media±DE, mediana (RI). \*Significación estadística entre el basal y los 12 meses. Test de Wilcoxon. \*\*Significación estadística entre pacientes con EM y controles. Test U de Mann-Whitney. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartílico.

**Tabla 12.** Estudio longitudinal de los porcentajes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en sus diferentes estadios de diferenciación y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados y reguladores y T CD8<sup>γδ+</sup> en los 23 pacientes con EM en basal, a mes 3, mes 6 y a 1 año de tratamiento con IFNβ-1a y en los controles.

% Subpoblaciones de Linfocitos T	Pacientes con EM (N: 23)				Controles (N: 26)
	Basal	Mes 3 post-IFNβ-1a	Mes 6 post-IFNβ-1a	Mes 12 post-IFNβ-1a	
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> Virgenes	46,24±13,69 43,20 (27,20)	41,59±11,61 38,16 (29,08)	37,83±11,20 38,16 (29,07)	40,21±10,46 39,83 (35,24)	42,41±14,65 43,04 (36,87)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> Memoria central	48,14 ± 11,66 44,01 (43,07)	48,47 ± 12,32 49,86 (40,93)	49,97±14,19 50,82 (40,93)	46,35±11,13 46,33 (35,27)	40,19±12,23 42,67 (37,49)
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> Memoria efectores	9,21 ± 3,34 8,58 (6,87)	10,53±3,72 10,71 (7,46)	13,09±7,87 11,47 (8,04)	13,43±6,17 12,17 ( )	15,03±6,68 13,19 (10,82)
CD8 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> Activados	7,74±5,19 8,35 (4,46)	11,59±7,64 9,50 (5,12)	13,35±7,91 12,33 (8,65)	**17,68±11,89 13,08 (8,66)	<sup>§</sup> 15,88±6,26±5,43 4,88 (2,35)
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Reguladores	1,76±0,75 2,04 (0,87)	3,47±3,43 2,23 (1,32)	3,81±3,21 2,68 (1,53)	** <sup>§</sup> 5,88±4,87 3,89 (2,32)	<sup>§</sup> 3,67±2,49 3,10 (1,81)
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> Reguladores	0,22±0,40 0,05 (0,02)	0,57±0,72 0,31 (0,08)	0,59±0,85 0,27 (0,05)	*1,05±2,04 0,48 (0,24)	*0,50±0,39 0,38 (0,18)
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup> Virgenes	38,36±19,53 34,22 (23,10)	*47,21 ± 19,16 48,99 (39,31)	32,12±14,47 31,23 (19,30)	32,15±10,97 29,56 (25,26)	<sup>§</sup> 22,19±12,81 21,31 (13,15)
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> Memoria central	29,16±15,63 28,88 (14,76)	23,16±10,29 22,09 (12,90)	*20,19±10,38 19,02 (12,64)	**15,30±6,93 12,89 (8,88)	12,23±6,34 11,01 (6,65)
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> Memoria efectores	31,96±12,87 32,50 (23,29)	*28,26±10,16 26,44 (20,92)	28,45±6,72 28,80 (23,83)	28,97±13,37 27,39 (17,20)	37,51±14,06 37,23 (26,11)
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> Efectores	26,97±10,15 25,31 (16,54)	21,44±14,91 18,78 (9,26)	24,61±14,35 21,42 (10,73)	26,72±12,36 25,31 (16,54)	27,26±11,45 24,18 (19,72)
CD8 <sup>+</sup> TCR <sup>γδ+</sup>	1,61±1,19 1,23 (0,57)	1,31±0,89 1,24 (0,41)	2,94±6,66 0,99 (0,50)	1,22±1,64 0,61 (0,24)	1,35±0,62 1,12 (0,80)

Los datos se expresan como media±DE, mediana (RI). \* p<0,05 con el basal, \*\*p<0,01 con el basal, <sup>§</sup>p<0,05 con M3, <sup>¶</sup>p<0,05 con M6, <sup>¶¶</sup>p<0,01 con M6, <sup>δ</sup>p<0,05 con M12, <sup>δδ</sup>p<0,01 con M12. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartílico.

**Figura 19.** Modificaciones en el estudio longitudinal en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (B) en los 23 pacientes con EM a lo largo del seguimiento. Los diagramas de caja muestran el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores en los 23 pacientes en el estudio basal y a los 12 meses de tratamiento con IFNβ-1a (C y D).



#### **4.2.4.1. Efectos *in vivo* del interferón beta-1a sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de sangre periférica en pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento**

Al comparar los pacientes respondedores al tratamiento y los no respondedores, se observó que en el estudio basal, los respondedores presentaron mayor porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores (CD4<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup>T<sub>Reg</sub>;  $1,38 \pm 1,01$  en los respondedores frente a  $0,97 \pm 0,69$  en los no respondedores) (Tabla 10) y mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ( $0,25 \pm 0,50$  en los respondedores frente a  $0,18 \pm 0,24$  en los no respondedores) (Tabla 13).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria central descendieron significativamente en los pacientes respondedores ( $p=0,01$ ), no siendo así en los no respondedores. (Tabla 13, Figura 20). También se encontró, aunque no de forma significativa, mayor número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores en el estudio basal en los pacientes no respondedores. Por el contrario, los pacientes respondedores presentaron mayor porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes al compararlos con los no respondedores (Tabla 13).

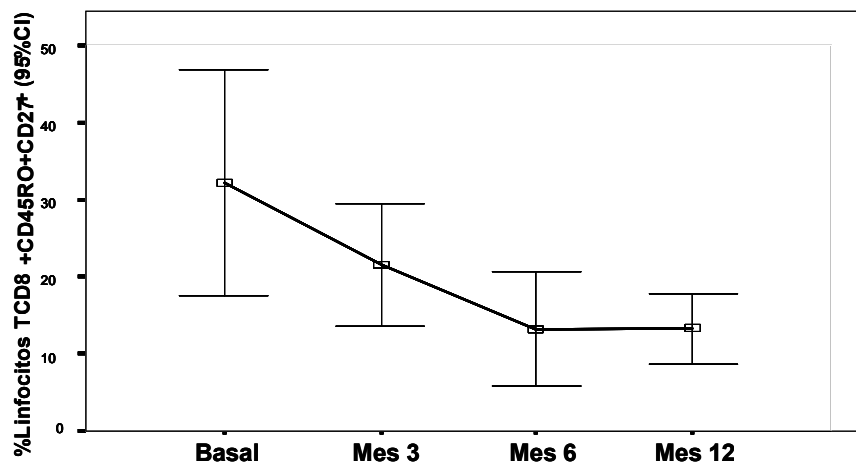


**Tabla 13.** Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (vírgenes, memoria central y memoria efectores) y CD8<sup>+</sup> (activados, reguladores, vírgenes, memoria central, memoria efectores y efectores) en pacientes con EM, respondedores y no respondedores, basal y a 1 año de tratamiento con IFNβ-1a y en controles sanos.

	Pacientes EM respondedores (N:14)		<i>p</i> *	Pacientes EM no-respondedores (N: 9)		<i>p</i> *	Controles (C) (N: 26)	<i>p</i> ** <sup>1</sup> (respondedores)	<i>p</i> ** <sup>2</sup> (no-respondedores)
	Basal	12-meses IFNβ		Basal	12-meses IFNβ			<i>p</i> entre basal y C	<i>p</i> entre basal y C
								<i>p</i> entre 12-meses y C	<i>p</i> entre 12-meses y C
<b>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup></b> <b>Linfocitos T vírgenes</b>	46,00±15,12 46,63 (31,20)	39,89±8,36 39,86 (36,98)	NS	38,15±12,89 41,69 (23,86)	40,77±14,08 41,39 (27,77)	NS	42,41±14,65 43,04 (36,87)	NS NS	NS NS
<b>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup></b> <b>Memoria central</b>	45,51±13,59 43,10 (34,49)	45,52±9,72 46,33 (38,49)	NS	51,65±9,93 48,07 (44,01)	47,82±13,89 47,29 (33,83)	NS	40,19±12,23 42,67 (37,49)	NS NS	NS NS
<b>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup></b> <b>Memoria efectores</b>	8,48±3,78 7,73 (5,32)	14,59±7,31 13,33 (8,97)	NS	10,19±3,08 10,24 (7,09)	11,40±2,77 11,32 (8,80)	NS	15,03±6,68 13,19 (10,82)	NS NS	NS NS
<b>CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup></b> <b>Activados</b>	7,13±3,74 8,79 (3,09)	18,53±12,54 15,28 (9,35)	<b>0,05</b>	8,65±7,18 5,49 (3,74)	16,19±11,32 12,67 (7,53)	NS	6,26±5,43 4,88 (2,35)	NS <b>0,005</b>	NS NS
<b>Linfocitos T</b> <b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	2,23±0,5 2,23 (1,89)	7,35±5,49 6,19 (3,08)	<b>0,04</b>	1,19±0,59 0,87 (0,84)	3,32±1,80 3,37 (1,52)	<b>0,06</b>	3,67±2,49 3,10 (1,81)	NS <b>0,08</b>	<b>0,08</b> NS
<b>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup></b>	0,25±0,50 0,05 (0,02)	1,43±2,41 0,63 (0,22)	NS	0,18±0,24 0,09 (0,007)	0,49±3,47 0,43 (0,25)	NS	0,50±0,39 0,38 (0,18)	NS NS	<b>0,06</b> NS
<b>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup></b> <b>Linfocitos T vírgenes</b>	41,76±18,39 34,22 (33,09)	33,28±13,18 33,42 (21,15)	NS	31,57±22,78 30,26 (10,26)	30,21±6,00 29,19 (26,93)	NS	22,19±12,81 21,31 (13,15)	NS NS	NS NS
<b>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup></b> <b>Memoria central</b>	30,87±17,73 31,06 (14,76)	13,91±6,28 12,07 (8,66)	<b>0,01</b>	25,75±11,82 28,16 (13,42)	17,72±7,81 16,60 (12,05)	NS	12,23±6,34 11,01 (6,65)	<b>0,02</b> NS	NS NS
<b>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup></b> <b>Memoria efectores</b>	32,24±15,65 32,50 (17,27)	28,33±14,21 24,82 (16,49)	NS	31,35±2,85 32,53 (28,39)	30,02±12,76 28,09 (24,32)	NS	37,51±14,06 37,23 (26,11)	NS NS	NS NS
<b>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup></b> <b>Efectores</b>	24,46±6,29 22,84 (18,78)	26,87±13,79 28,55 (14,56)	NS	31,16±15,46 36,57 (13,73)	26,58±10,51 23,18 (19,24)	NS	27,26±11,45 24,18 (19,72)	NS NS	NS NS
<b>Linfocitos T</b> <b>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>γδ</sup><sup>+</sup></b>	1,68±0,78 1,67 (0,96)	1,15±1,61 0,45 (0,19)	NS	1,55±1,64 0,91 (0,45)	1,37±1,85 0,63 (0,34)	NS	1,35±0,62 1,12 (0,80)	NS NS	NS NS

Los datos se expresan como media±DE, mediana (RI). \* Significación estadística entre el basal y los 12 meses. Test de Wilcoxon. \*\* Significación estadística entre pacientes y controles. \*\*<sup>1</sup> Significación estadística entre respondedores y controles. \*\*<sup>2</sup> Significación estadística entre no respondedores y controles. Test U de Mann-Whitney. DE: desviación estándar. RI: rango intercuartílico.

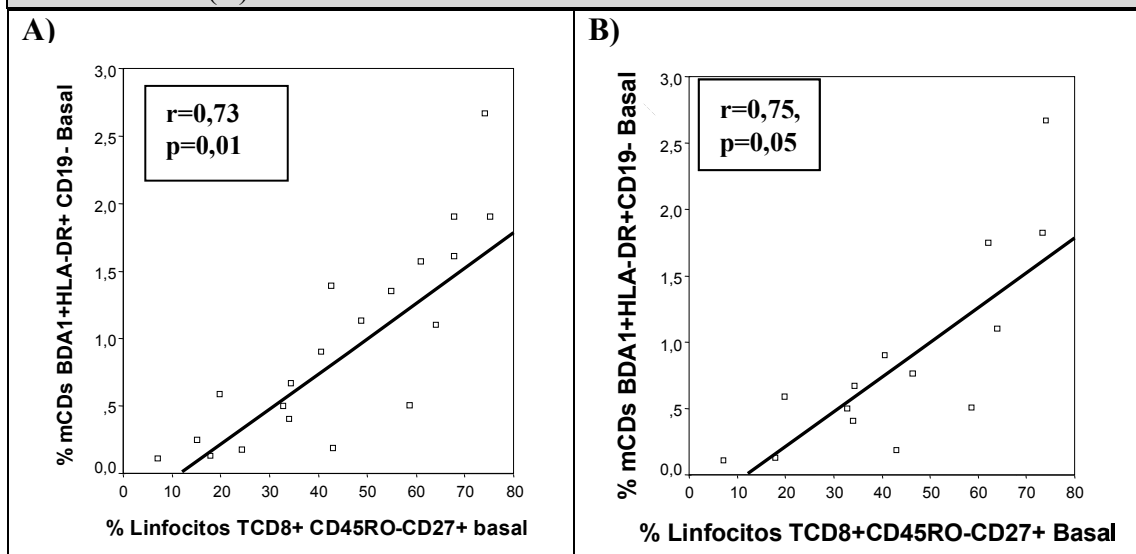
**Figura 20.** Modificaciones en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) en el estudio longitudinal en el grupo de 14 pacientes respondedores durante el seguimiento.



#### 4.2.5. Correlaciones entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el estudio basal y al año de tratamiento con Interferón beta-1a

Se encontraron las siguientes correlaciones en el estudio basal: Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> correlacionaron directamente con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup> ( $r=0,900$ ,  $p=0,037$ ) en los 23 pacientes con EM. En los respondedores, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> correlacionaron inversamente con las pCDs BDCA-2<sup>+</sup> ( $r=-1,000$ ,  $p=0,000$ ). Asimismo, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> correlacionaron inversamente con las pCDs CD11c<sup>-</sup> ( $r=-0,841$ ,  $p=0,03$ ).

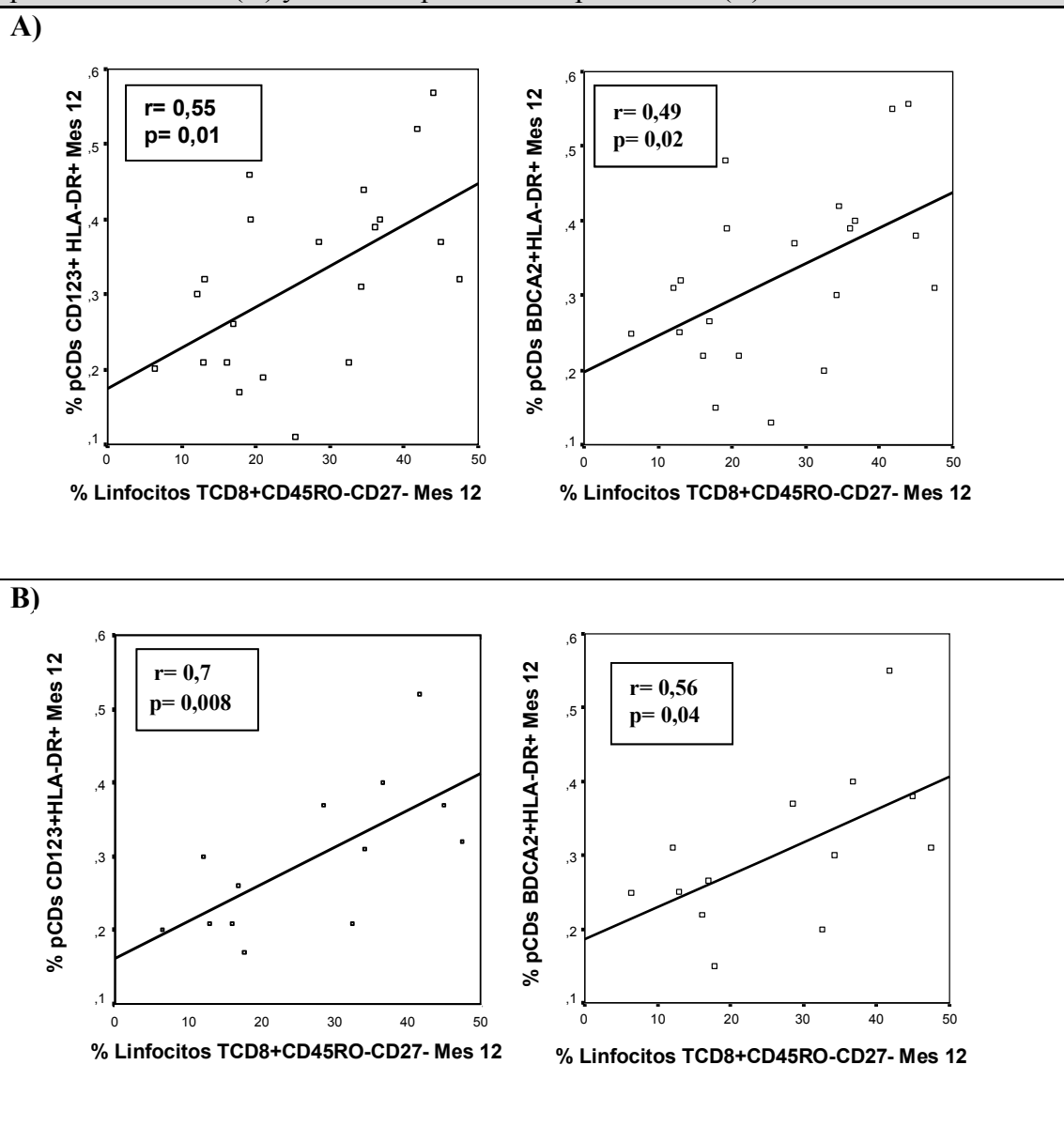
**Figura 21.** Correlación entre las células dendríticas mieloides y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes en el estudio basal en los 23 pacientes (A) y en los 14 pacientes respondedores al tratamiento (B).



Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes correlacionaron con las mCDs BDCA1<sup>+</sup> en los 23 pacientes EM ( $r=0,73$ ,  $p=0,01$ ) y en los 14 pacientes respondedores ( $r=0,75$ ,  $p=0,05$ ) (Figuras 21 A y B).

A mes 12 de tratamiento con IFN $\beta$ -1a, las pCDs correlacionaron directamente con los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) en los 23 pacientes con EM ( $r=0,55$ ,  $p=0,01$  para las pCDs CD123<sup>+</sup> y  $r=0,49$ ,  $p=0,02$  para las pCDs BDCA-2<sup>+</sup>, respectivamente) (Figura 22.A) y en el grupo de los respondedores al tratamiento ( $r=0,7$ ,  $p=0,008$  para las pCDs CD123<sup>+</sup> y  $r=0,56$ ,  $p=0,04$  para las pCDs BDCA2<sup>+</sup>) (Figura 22.B).

**Figura 22.** Correlación entre las células dendríticas plasmacitoides (CD123<sup>+</sup> y BDCA-2<sup>+</sup>) y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores a mes 12 de tratamiento con IFN $\beta$ -1a en los 23 pacientes con EM (A) y en los 14 pacientes respondedores (B).



#### 4.2.6. Aumento de la función supresora de los T<sub>Reg</sub> *ex vivo*

En un subgrupo de 10 de los 23 pacientes se estudió la función supresora de los T<sub>Reg</sub> en situación basal y a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a. Se observó un defecto significativo en la función supresora de los linfocitos T reguladores en los 10 pacientes con EM en el estudio basal frente a 5 controles sanos. Este defecto se confirmó tanto en cultivos de linfocitos T respondedores estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 ( $p=0,01$ ) como en los estimulados con BLCLs alogénicas ( $p<0,01$ ) (Tabla 14) (de Andres et al., 2007). Según se ha descrito previamente, se empleó para los cultivos una relación de linfocitos T respondedores: T<sub>Reg</sub> de 2:1, en la cual las diferencias funcionales entre pacientes y controles fueron máximas (datos no mostrados). Se observó un aumento significativo en la función supresora de los pacientes a mes 6 ( $p=0,001$ ) y mes 12 de tratamiento ( $p=0,004$  con  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28 y  $p=0,01$  en CML) con IFN $\beta$ -1a. Además no se encontraron diferencias significativas en la actividad supresora entre pacientes a mes 12 de tratamiento y los controles sanos (Tabla 14). Ningún paciente experimentó descenso en la función supresora a lo largo del tratamiento, salvo un paciente que mantuvo el mismo porcentaje a mes 3 de tratamiento frente al basal.

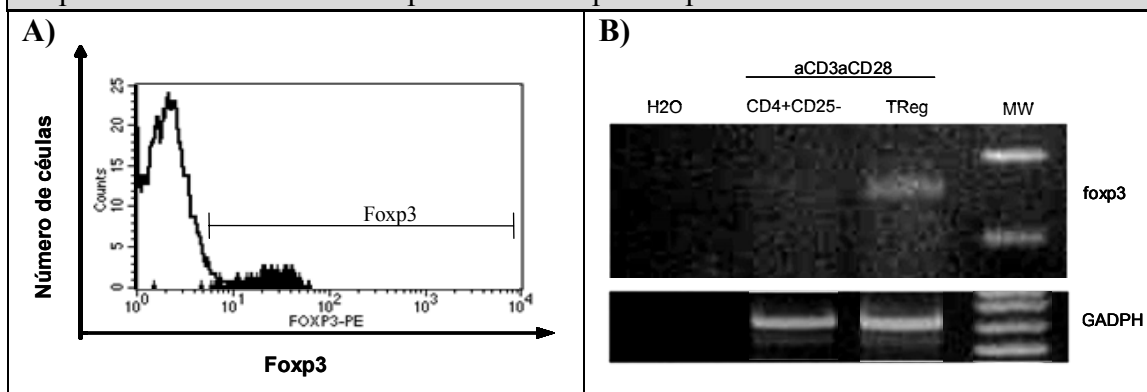
**Tabla 14.** Porcentaje de supresión de los T<sub>Reg</sub> en 10 pacientes EM en el estudio basal y a los 12 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a y de 5 controles sanos.

%Supresión	Basal	Mes 12	*p	controles	<sup>**1</sup> p entre basal y controles	<sup>**2</sup> p entre mes 12 y controles
$\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28	26,39 $\pm$ 7,03 24,79 (13,54)	50,72 $\pm$ 19,84 41,35 (36,23)	<b>0,004</b>	74,22 $\pm$ 20,57 63,06 (21,14)	<b>0,01</b>	NS
CML	25,94 $\pm$ 10,59 26,09 (19,83)	47,77 $\pm$ 8,88 50,68 (12,43)	<b>0,01</b>	64,15 $\pm$ 17,73 61,99 (33,19)	<b>0,006</b>	NS (0,07)

Los datos se presentan como media $\pm$ DE, mediana (RI). \*Significación estadística entre el basal y los 12 meses. Test de Wilcoxon. <sup>\*\*1</sup>Significación estadística entre pacientes en basal y controles. <sup>\*\*2</sup>Significación estadística entre pacientes a mes 12 y controles. Test U de Mann-Whitney. DE: Desviación estándar. RI: Rango intercuartílico.

También se analizó, por citometría de flujo, la expresión intranuclear de Foxp3 en los T<sub>Reg</sub> y los linfocitos T respondedores purificados *ex vivo* de pacientes y controles. El factor de transcripción nuclear Foxp3 se expresó en un 98,37% de los T<sub>Reg</sub> purificados frente a un 1,19% de los linfocitos T respondedores (Figura 23).

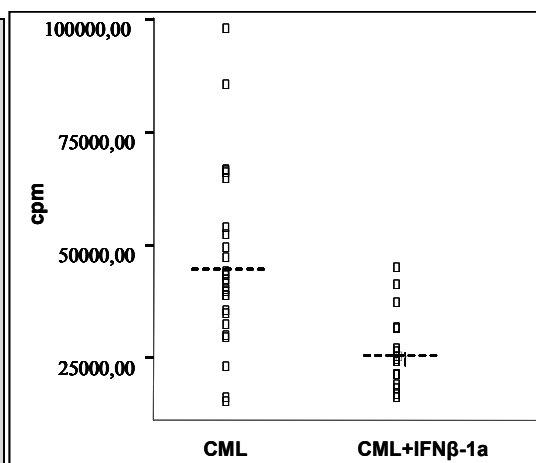
**Figura 23.** A) Expresión intranuclear Foxp3 *ex vivo*, analizada por citometría de flujo, en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y linfocitos T respondedores de células mononucleares de sangre periférica. La figura muestra la expresión de Foxp3 en un 98,37% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (en negro) y en un 1,19% de los linfocitos T respondedores (blanco). B) Expresión de ARNm de Foxp3 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> estimulados durante 5 días con  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 y en linfocitos T respondedores. Como control positivo se empleó expresión del ARNm de la GADPH.



#### 4.2.7. Aumento de la función supresora de los T<sub>Reg</sub> *in vitro*

Se observó un aumento de la actividad supresora de los T<sub>Reg</sub> *in vitro* al añadir IFN $\beta$ -1a a los cultivos. Asimismo, el IFN $\beta$ -1a produjo un descenso en las respuestas linfoproliferativas de los linfocitos T respondedores estimulados alogénicamente frente al CML sin IFN $\beta$ -1a ( $p=0,001$ ; Figura 24). La adición del IFN $\beta$ -1a a los cocultivos de los T<sub>Reg</sub>, indujo una mayor actividad supresora frente al CML solo. No se vio efecto en la apoptosis medida como porcentaje de células apoptóticas (anexina positivas) o muertas (yoduro de propidio positivas) (datos no mostrados). Tras 3 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a, los T<sub>Reg</sub> de los pacientes EM tratados fueron más susceptibles al efecto *in vitro* inducido por el IFN $\beta$ -1a (46,64% frente a 37,39%; Tabla 15).

**Figura 24.** Cultivo mixto linfocitario (CML) con los linfocitos T respondedores y blastos inmortalizados con virus Epstein-Barr y tratados con mitomicina. El IFN $\beta$ -1a inhibió significativamente las respuestas linfo-proliferativas en pacientes EM y en controles sanos. Se muestran la proliferación en el CML solo y el CML más IFN $\beta$ -1a. Cada símbolo representa un paciente EM (N=27). La media de cpm obtenida en estos 27 pacientes con EM se muestra por la línea punteada.



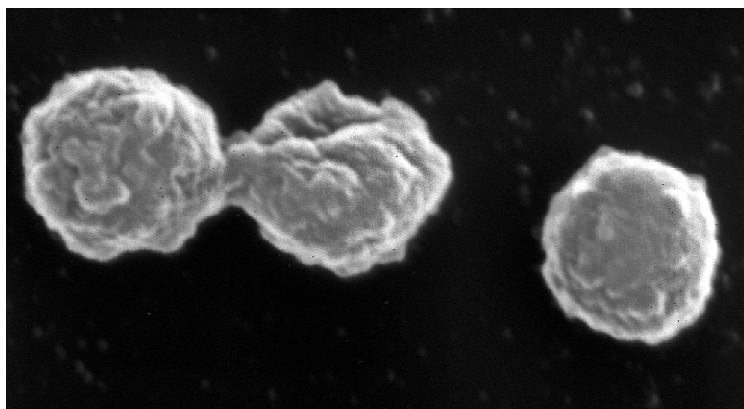
CML: Cultivo mixto linfocitario; cpm: cuentas por minuto

**Tabla 15.** Porcentaje de supresión de los T<sub>Reg</sub>, tras adición de IFN $\beta$ -1a *in vitro*, sobre respuestas linfoproliferativas estimuladas alogénicamente. (T<sub>Reg</sub> de pacientes EM en el estudio basal y de pacientes EM tras 3 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a).

	Porcentaje de supresión en CML
Pacientes EM en basal (N=8)	37,39 $\pm$ 24,29 44,32 (35,87)
Pacientes EM tras 3 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a (N=5)	46,64 $\pm$ 38,99 45,91 (-)

Los datos se presentan como media  $\pm$ DE, mediana (RI). CML: Cultivo mixto linfocitario. DE: desviación estándar. RI: Rango Intercuartílico.

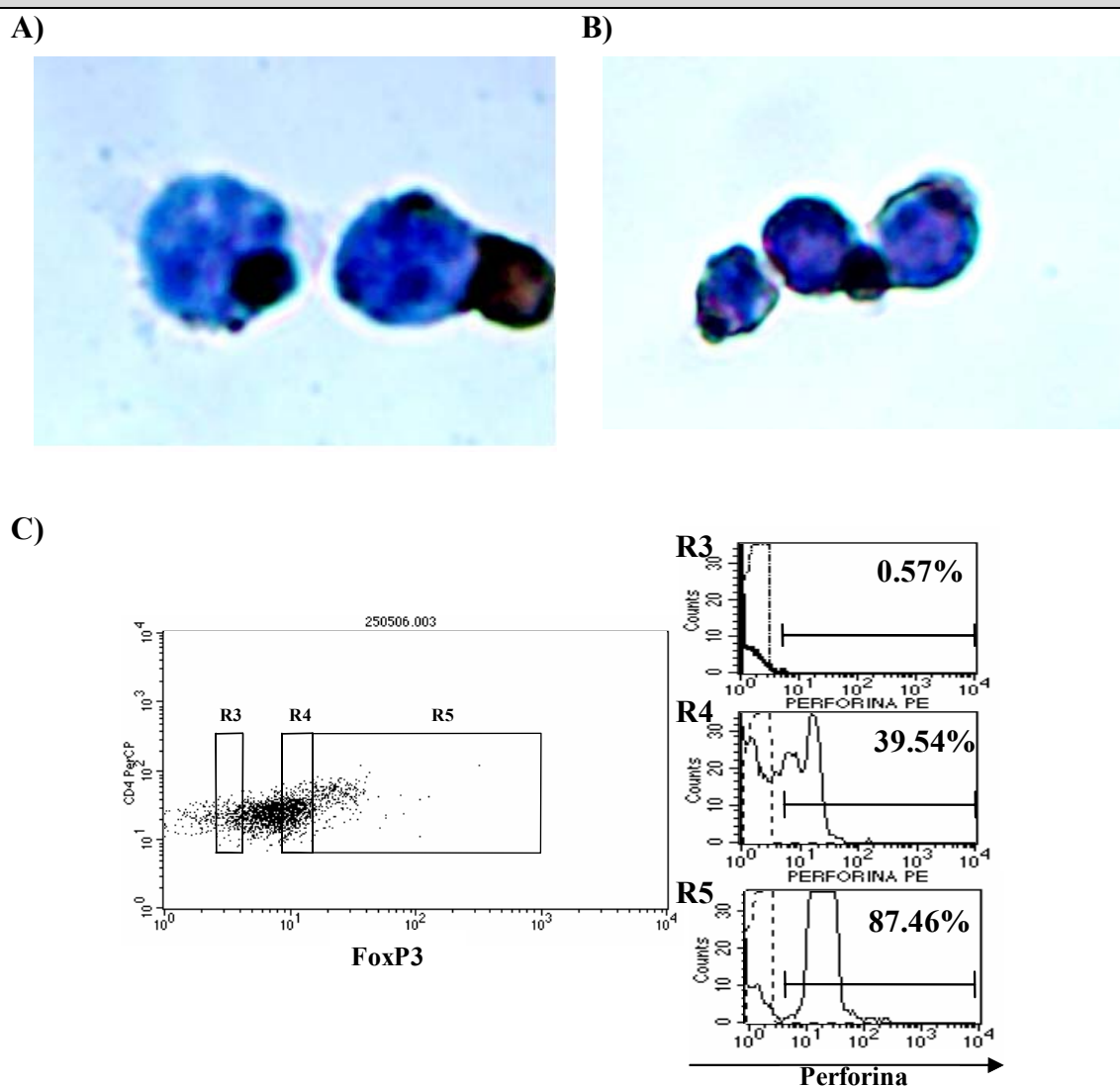
Asimismo, se realizaron estudios preliminares donde se observó un aumento en la expresión de perforina por parte de los T<sub>Reg</sub> al añadir IFN $\beta$ -1a a los cultivos. Los cultivos de T<sub>Reg</sub> purificados de controles sanos y estimulados durante 24 horas con una mezcla de linfocitos B alogénicos inmortalizados con virus de Epstein-Barr, según se ha descrito previamente, expresaban mayor cantidad de perforina tras la adición *in vitro* de



**Figura 25.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> purificados y estimulados con  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28 durante 24h.

IFN $\beta$ -1a que los cultivos estimulados sin IFN $\beta$ -1a exógeno. Se realizó por citometría de flujo y por tinción inmunohistoquímica, según se muestra en las siguientes imágenes (Figura 26).

**Figura 26.** Expresión de perforina en cultivos de T<sub>Reg</sub> estimulados (A) y tras la adición de IFN $\beta$ -1a (B). (Expresión de perforina positiva, en color rojizo). C) Expresión de perforina en cultivos de T<sub>Reg</sub> purificadas y estimulados, de acuerdo con la expresión de FoxP3.

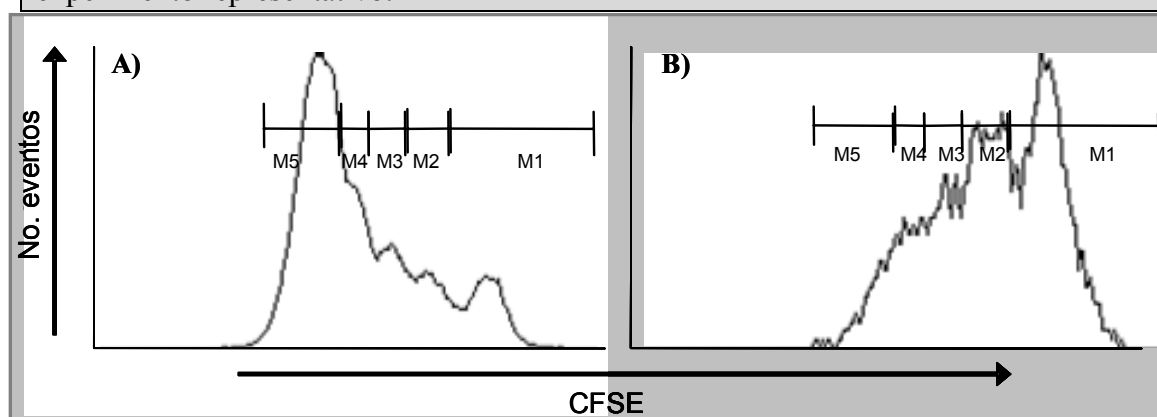


#### 4.2.8. Estudios de linfo-proliferación mediante marcaje con Carboxifluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE)

Otra forma de comparar las respuestas linfo-proliferativas entre los linfocitos T reguladores y los linfocitos T respondedores, es estudiar el número de ciclos de división celular. Para ello, se realizaron estudios de dilución de CFSE, según se ha descrito

previamente. Se obtuvieron las CMSP de 4 pacientes con EM y 4 controles sanos y se marcaron con CFSE y se estimularon durante 5 días con anti-CD3 y anti-CD28. Se observó un porcentaje mucho más elevado de proliferación (CFSE<sup>low</sup>) en los linfocitos TCD25<sup>low</sup> (linfocitos T activados) (mediana±DE: 77,15±14,43% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales) que en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (mediana±DE: 59,84±15,50%) (Figura 27).

**Figura 27.** Se observó mayor porcentaje de linfocitos T CD25<sup>low</sup> en división frente a los linfocitos TCD25<sup>high</sup>, al marcarlos con CFSE y estimularlos durante 5 días con anti-CD3 y anti-CD28: A) Puerta en linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> (linfocitos T activados); y B) Puerta en linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (linfocitos T reguladores). Se muestra 1 experimento representativo.



CD25<sup>low</sup>: Acumulación en M1 (No proliferación) y M2 (1 división)

CD25<sup>high</sup>: Acumulación en M5 (Al menos 4 divisiones).

#### 4.2.9. Estudios funcionales de supresión de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores *ex vivo* en reacción mixta linfocitaria.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se purificaron en 3 pasos por técnicas inmunomagnéticas según se ha descrito previamente. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se recogieron de los pasos de lavado. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (50x10<sup>3</sup>) se estimularon con BLCLs. Para cuantificar la función supresora, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se cocultivaron con linfocitos CD4<sup>+</sup> autólogos a diferentes ratios (1:1, 1:2, 1:4) durante seis días. Las células se pulsaron con 1 µCi de timidina tritiada durante las últimas 6h de cultivo. La actividad estimuladora fue calculada en c.p.m. El efecto inhibitor de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> se midió a los ratios descritos. Se realizaron experimentos paralelos con los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>.

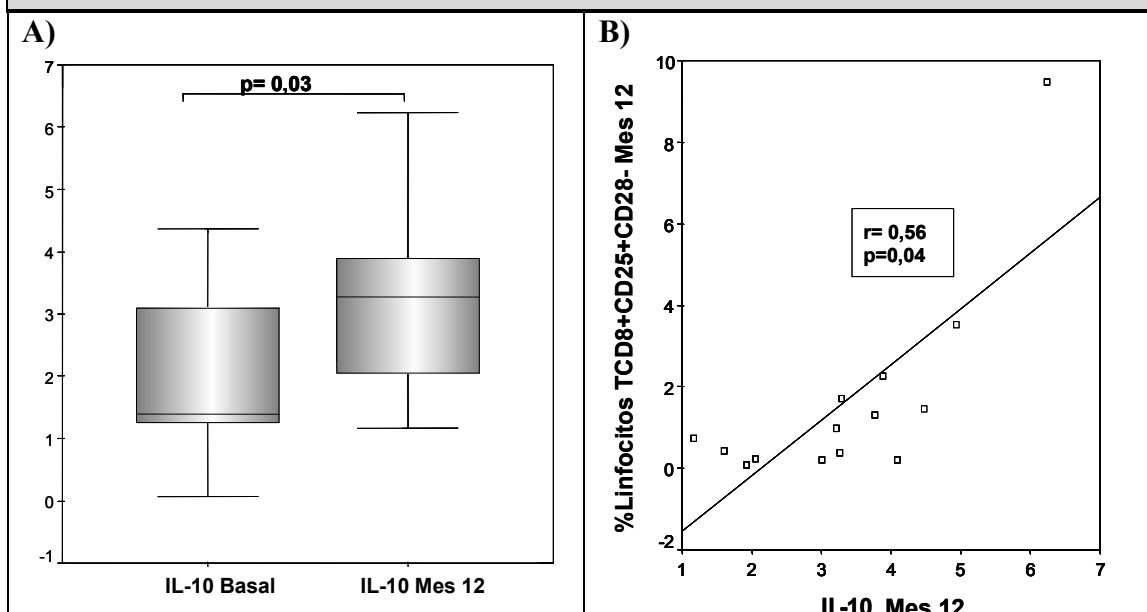


Los linfocitos T  $CD8^+CD25^+CD28^-$  ejercieron una potente supresión de las respuestas T  $CD4^+$ . Estas células causaron un efecto inhibitor del 70% en las células proliferantes, mientras que los linfocitos T  $CD8^+CD25^+CD28^+$  no ejercieron supresión alguna.

#### 4.2.10. Cambios en los niveles séricos de citocinas en los pacientes a los 12 meses del tratamiento con Interferón beta-1a

Se midieron por ELISA las citocinas IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  y granzima-B en los sueros de 23 pacientes en situación basal y a los 12 meses de tratamiento con IFN $\beta$ -1a. Se observaron cambios significativos únicamente en los niveles séricos de IL-10. Los niveles séricos de IL-10 en los 23 pacientes aumentaron al año de tratamiento (de  $2,18 \pm 1,31$  pg/ml en situación basal a  $3,14 \pm 1,56$  pg/ml a mes 12,  $p=0,06$ ). Este aumento fue más marcado en los pacientes respondedores ( $2,09 \pm 1,39$  pg/ml en situación basal a  $3,23 \pm 1,36$  pg/ml a mes 12,  $p=0,03$ ) (Figura 28.A). Asimismo, en los pacientes respondedores, se observó correlación directa entre los niveles séricos de IL-10 y los linfocitos T  $CD8^+$  supresores ( $CD8^+CD25^+CD28^-$ ) a mes 12 de tratamiento ( $r=0,56$ ,  $p=0,04$ ) (Figura 28.B).

**Figura 28.** Los diagramas de caja muestran los niveles séricos de IL-10 en el grupo de pacientes respondedores en situación basal y a mes 12 de tratamiento (A). Correlación entre los niveles séricos de IL-10 y los linfocitos T  $CD8^+CD25^+CD28^-$  a mes 12 de tratamiento en los pacientes respondedores (B).



Sin embargo, se observó correlación inversa entre los niveles séricos de IL-10 y las pCDs BDCA2+ en situación basal en los 23 pacientes ( $r = -0,52$ ,  $p = 0,03$ ) y de forma más marcada en los pacientes respondedores ( $r = -0,68$ ,  $p = 0,03$ ).

#### **4.2.11. Factor predictivo de respuesta al tratamiento con Interferón beta-1a**

Al comparar los dos grupos de pacientes, respondedores y no respondedores al tratamiento con IFN $\beta$ -1a, en el estudio basal, únicamente se encontraron valores significativamente más bajos en las mCDs BDCA-1<sup>+</sup> en los pacientes no respondedores. Esto se cumplió en las dos definiciones de no respondedores; tanto en los pacientes no respondedores ( $n=9$ ,  $p = 0,01$ ), como en los pacientes que únicamente habían aumentado el EDSS ( $n=2$ ,  $p = 0,04$ ).

Para calcular el porcentaje de mCDs que podría ser usado como punto de corte para determinar un valor predictivo positivo de respuesta al tratamiento con IFN $\beta$ -1a durante el primer año, se realizó la curva ROC (Figura 29.A). El área bajo la curva para las mCDs BDCA-1 fue de 0,79 (95% intervalo de confianza, CI: de 0,59 a 0,98). Tomando como punto de corte basal de las mCDs BDCA1<sup>+</sup> de 0,4%, se obtuvo una sensibilidad del 80% y una especificidad del 80% de respuesta al tratamiento con IFN $\beta$ -1a.

Escogiendo un valor basal para las mCDs BDCA-1<sup>+</sup> de menos de 0,4% se obtuvo un valor predictivo positivo del 72,7% de tener un brote durante el primer año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a y escogiendo un valor de más de 0,4% se obtuvo un valor predictivo negativo del 85,7% de tener un brote (ausencia de brote) durante el tratamiento con IFN $\beta$ -1a.

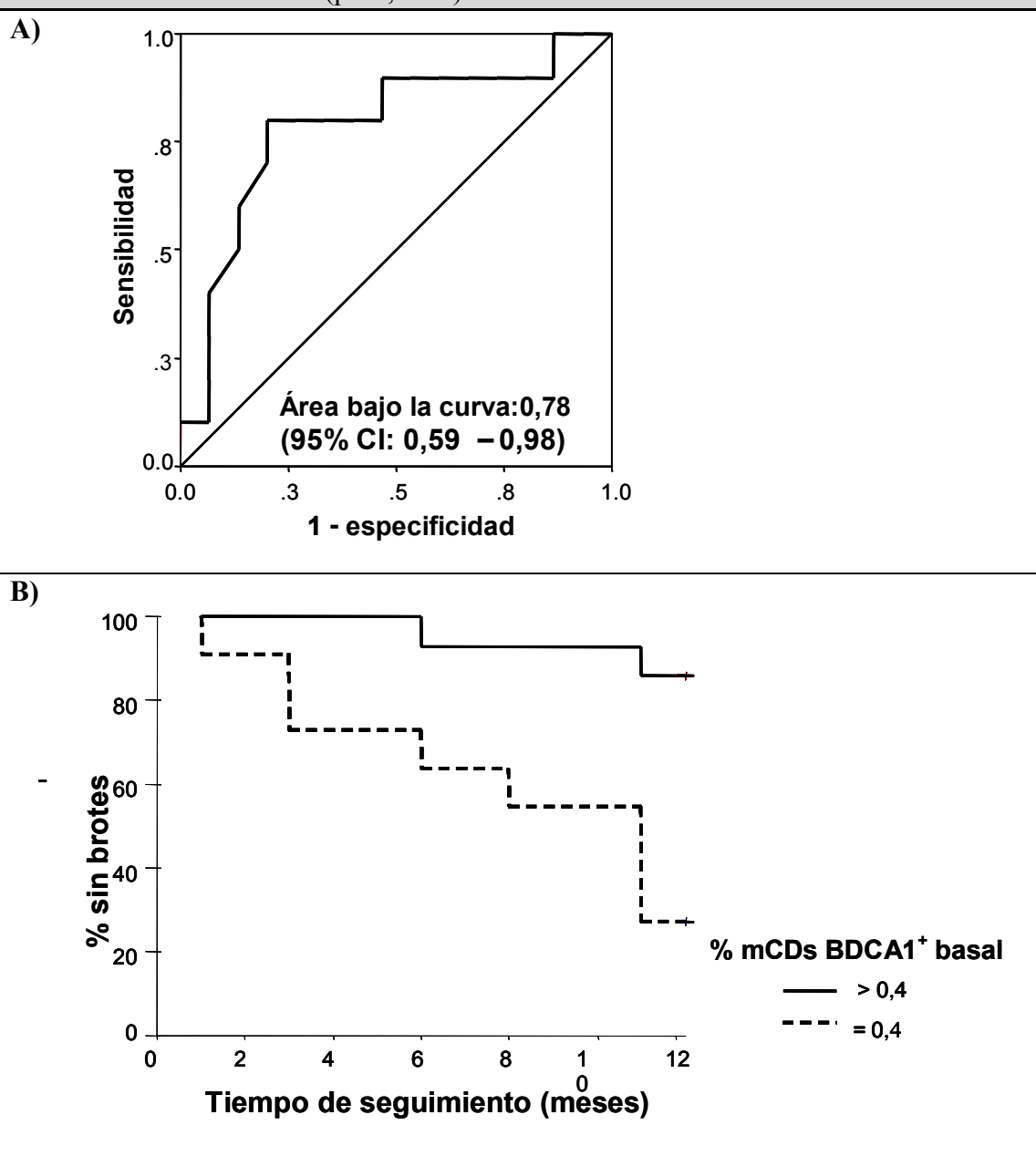
Se realizaron curvas de Kaplan-Meier para determinar el tiempo hasta desarrollar actividad clínica de la enfermedad (desarrollar un brote) en función del nivel basal de mCDs BDCA1<sup>+</sup> en pacientes tratados con IFN $\beta$ -1a. Según se muestra en la Figura 29.B, un 85,71% de pacientes con un valor basal de mCDs  $> 0,4\%$  permanecieron libres de brotes, durante los 12 meses de seguimiento, frente a un 27,3% del grupo de pacientes con valor basal de mCDs  $< 0,4\%$  ( $p = 0,0025$ ).

##### **4.2.11.1. Análisis multivariante: regresión logística**

Se realizó un modelo de regresión logística de Cox multivariante para las variables con una asociación estadísticamente significativa con la actividad clínica de EM en el

primer año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a. De las diferentes variables estudiadas, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> reguladores, la única variable que presentó asociación estadísticamente significativa con actividad clínica de la EM fue el porcentaje basal de mCDs BDCA1<sup>+</sup>. Se realizó el análisis de regresión de Cox en función del nivel basal de mCDs BDCA1<sup>+</sup> < 0,4% y se obtuvo un riesgo relativo (Hazard ratio) de 7,18 (IC: 1,5-34,0). Los pacientes con valores basales de mCDs BDCA1<sup>+</sup> < 0,4% tuvieron 7,18 veces más probabilidad de tener un brote en el tiempo de seguimiento que los pacientes con valores basales de mCDs BDCA1<sup>+</sup> > 0,4%.

**Figura 29.** A) La curva ROC se dibujó para calcular el punto de corte del porcentaje de mCDs BDCA1<sup>+</sup> basal para predecir la respuesta clínica al IFN $\beta$ -1a. Área bajo la curva (CI 95%): 0,59-0,98 La curva ROC emplea los porcentajes basales de mCDs BDCA1<sup>+</sup> como predictivos de respuesta clínica al tratamiento con IFN $\beta$ -1a a 1 año. La curva muestra el equilibrio entre sensibilidad y especificidad. Un aumento en la sensibilidad se acompañará de un descenso en la especificidad. La precisión de la predicción aumenta según la curva se aproxima a la parte izquierda y superior del espacio ROC. El área bajo la curva es el porcentaje de pares de datos aleatorios para los que la predicción es cierta. B) Las curvas de Kaplan-Meier estiman la respuesta al IFN $\beta$ -1a durante el seguimiento en función de los niveles basales de mDCs BDCA1<sup>+</sup>. Según se observa, el 85,71% de los pacientes con >0,4% mDCs basales no desarrollaron brote en los 12 meses del seguimiento, mientras que el 27,3% de los pacientes con  $\leq$ 0,4% mDCs estuvieron libres de brotes ( $p=0,0025$ ).



## **5. *DISCUSIÓN***

## **5.1. ESTUDIO OBSERVACIONAL DEL TRATAMIENTO CON METILPREDNISOLONA EN EL BROTE DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE**

La EM es una enfermedad crónica inflamatoria del SNC, que se caracteriza por desmielinización y daño axonal. Las lesiones precoces de EM se caracterizan por activación de la microglía, infiltración de linfocitos T, B y macrófagos. Se ha demostrado recientemente que hay acumulación clonal de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en las lesiones y en el LCR de los pacientes con EM.

Las CDs son capaces de regular las respuestas inmunológicas tanto frente a los antígenos extraños como a los propios, induciendo así una respuesta inmunológica efectora o bien de tolerancia (Banchereau et al., 2000). Las CDs se han relacionado con la inmunopatogénesis de la EM y se ha demostrado la presencia de ambas subpoblaciones de CDs, mCDs y pCDs, en el LCR de los pacientes de EM durante el brote (de Andrés C, 2000; De Andrés et al., 2000; Pashenkov et al., 2001a; Pashenkov et al., 2001b). En un estudio previo realizado por nuestro grupo, se demostró además un reclutamiento preferencial de pCDs en el SNC en una cohorte de pacientes con SCA que posteriormente fueron diagnosticados de EM (Sánchez-Ramón et al., 2004). En la EAE, el modelo murino de la EM, se ha descrito la presencia de CDs en las lesiones del SNC, principalmente en los espacios perivasculares, frecuentemente en contacto con los linfocitos (Matyszak and Perry, 1996). Datos recientes demuestran la presencia de CDs en meninges y plexos coroideos, así como en el parénquima cerebral inflamado (Pashenkov et al., 2003). También se ha demostrado recientemente la migración de CDs desde el SNC hasta los ganglios cervicales profundos, reforzando su papel en la presentación antigénica de antígenos provenientes del SNC.

El objetivo terapéutico en el tratamiento de los brotes de EM es reducir la inflamación tisular lo más eficazmente posible para prevenir la destrucción tisular y la pérdida axonal. La administración de MPiv representa el tratamiento de elección para los brotes de EM (Fox and Dunitz, 2003; Fox RJ, 2003). Sin embargo, los mecanismos de acción inmunológicos de los GC aún no se conocen en profundidad.

Se partió de la hipótesis de que los efectos selectivos de los GCs podrían estar relacionados con los diferentes números de receptores de GCs o las diferentes afinidades de los GCs en las células inmunológicas. Tras esta posibilidad, la sensibilidad de los GCs podría cambiar en relación al estado de activación de las

supboblaciones linfocitarias respectivas o al linaje celular. Se han realizado diferentes estudios acerca del efecto de la MP sobre las CDs en diversos contextos, pero nunca durante el brote. En esta memoria se demuestra un descenso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales y T CD4<sup>+</sup> activados y un descenso significativo en las proporciones de mCDs y pCDs tras tratamiento con MPiv en el brote de EM. Globalmente, el efecto beneficioso de la MPiv podría derivarse del bloqueo del reclutamiento de estas supboblaciones celulares hacia el SNC, inhibiendo así la inflamación en el SNC. De acuerdo con nuestros resultados, estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la dexametasona afecta la funcionalidad de las CDs, regulando selectivamente a la baja la expresión de moléculas coestimuladoras y reduciendo sus propiedades inmuno-estimuladoras (Moser et al., 1995). Shodell y cols. describieron que los corticosteroides disminuían la producción de IFN- $\alpha$  y el número de pCDs circulantes en individuos sanos. (Shodell and Siegal, 2001). Se ha demostrado que las CDs tímicas de rata expresan receptores de GCs y las CDs tímicas tratadas con dexametasona mostraron una capacidad aloestimuladora y de producción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  alteradas (Sacedon et al., 1999). En relación con los efectos de los GCs sobre las CDs humanas, los datos presentados en esta Memoria sugieren que la MPiv frena la maduración de las mCDs, permaneciendo éstas en un estado inmaduro (baja expresión de CD11c, HLA-DR y CD40) que podría ser tolerogénico para los linfocitos T. En relación con este último aspecto, Wakkach y cols. demostraron que una subpoblación de mCDs tolerogénicas era CD11c<sup>low</sup> (Wakkach et al., 2003). Además, el bloqueo de la interacción CD40-CD154 parece suprimir las respuestas T autorreactivas (Kuwana, 2003) y disminuye el rechazo de trasplantes alogénicos (Kirk et al., 2001). Estos datos son compatibles con los hallazgos descritos en esta Memoria, en particular, con el descenso en el porcentaje de las pCDs y mCDs y de los linfocitos T activados y el bloqueo de la maduración de las CDs. Otros autores han demostrado en esta misma línea de efectos que los GCs podrían actuar modulando la diferenciación de las CDs, su maduración y función (Piemonti et al., 1999; Vanderheyde et al., 1999). Asimismo, se ha observado que los GCs disminuyen la producción de IL-12p70, IL-6 y TNF- $\alpha$  por las CDs derivadas de monocitos (de Jong et al., 1999), mientras que aumentan la producción de IL-10 (Canning et al., 2000). Se ha observado que los GCs reducen significativamente los niveles de IL-3 en los linfocitos T de los pacientes con EM asintomáticos (Corrigan et al., 1995). La IL-3 es una citocina esencial para la diferenciación y proliferación de numerosos linajes hematopoyéticos. Por lo tanto, los efectos de los GCs podrían deberse en parte a una

potente inhibición de la producción de IL-3, debido a que la principal fuente de IL-3 son los linfocitos T activados. El ligando del FLT3 (FLT3-L), TNF- $\alpha$ , SCF y la IL-7 son factores importantes para las CDs de origen linfoide (CDs plasmacitoides), y el factor de transcripción Ikaros (Ik) se han implicado en la hematopoyesis de las CDs. El Ik7 bloquea la hematopoyesis de las CDs de origen linfoide, mientras que induce un aumento en el número y en el estado de maduración de los granulocitos (Galy et al., 2000). En la cohorte de pacientes con brote de EM, se evidenció neutrofilia de forma sistemática tras tratamiento con MPiv. Los resultados observados podrían deberse a que la MPiv disminuye la generación de citocinas relacionadas con la hematopoyesis de las pCDs, a la inducción de la expresión de Ik7 y a un posible bloqueo de la generación de pCDs. El descenso observado en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados tras la MPiv en el brote de EM podría deberse a efectos indirectos en las citocinas o a cambios en las CDs.

En concordancia con el estudio de MP *in vitro*, se ha descrito que los GCs en concentraciones farmacológicas inducen apoptosis en los macrófagos, monocitos y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de tipo Th1 (Leussink et al., 2001; Schmidt et al., 2001). Sin embargo, no puede descartarse un efecto directo de los GCs sobre los linfocitos T activados.

También el descenso en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados, podría explicarse como consecuencia de la expansión de los linfocitos T reguladores producida tras el tratamiento con MPiv, por la propia evolución del brote o la combinación de ambos, ya que se ha demostrado que los T<sub>Reg</sub> son capaces de suprimir la proliferación y la producción de citocinas de los linfocitos T convencionales CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Los linfocitos T<sub>Reg</sub> adaptativos representan linfocitos T CD4<sup>+</sup> que adquieren su función supresora tras su activación *in vitro* o *in vivo*. Estos T<sub>Reg</sub> suprimen activamente los linfocitos T efectoros autorreactivos, y pueden mediar la desviación inmunológica localizada o sistémica (Baecher-Allan et al., 2001). Los factores críticos determinantes para el desarrollo de los T<sub>Reg</sub> adaptativos incluyen el tipo y estado de diferenciación de las CPA y el entorno de citocinas durante la activación. La presentación antigénica por las CDs inmaduras en presencia de IL-10 y/o TGF- $\beta$  durante la activación linfocitaria podría promover la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en T<sub>Reg</sub> (Jonuleit et al., 2001). Se ha descrito previamente un aumento en los niveles séricos de IL-10 durante el brote, y un aumento en los niveles de cortisol secundariamente a la activación del eje hipotálamico-hipófiso-adrenal (de Andres et al., 2004; Rodriguez-Sainz Mdel et al.,



2002). En la cohorte de 40 pacientes con EM en brote, se observa un aumento moderado en el número de  $T_{Reg} CD4^+CD25^+$  y más significativamente en la subpoblación  $CD4^+CD25^{+high}$ , al compararlos con los controles sanos. Se ha descrito que en los pacientes estables con EMRR, los linfocitos  $T_{Reg} CD4^+CD25^{+high}$  están presentes en los mismos porcentajes que en los controles sanos (Viglietta et al., 2004). Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* de la función supresora de los  $T_{Reg} CD4^+CD25^{+high}$  demuestran un marcado defecto de la función supresora de estas células sobre la proliferación linfocitaria en los pacientes en remisión clínica con EMRR y durante el brote con respecto a los controles sanos (Baecher-Allan et al., 2004). De acuerdo con los datos presentados en esta Memoria, Khoury y cols. (Khoury et al., 2000), encontraron también que el aumento en el porcentaje de  $T_{Reg} CD4^+CD25^+$  durante el brote de EM se correlacionaba con un aumento en el volumen de la lesión en la RMN craneal medida por secuencias en T2. Otro estudio (Putheti et al., 2003) demostró que los porcentajes de linfocitos  $T_{Reg} CD4^+CD25^+$  y la expresión de IL-10 por los  $T_{Reg}$  se encontraban aumentados en el grupo de pacientes con EM con elevada carga lesional en secuencias T2 y las lesiones captantes de gadolinio en secuencias T1, comparados con el grupo de pacientes con baja carga lesional y sin lesiones captantes de gadolinio. Estos estudios y los resultados de esta Memoria sugieren que durante la actividad de la EM, la expansión de los  $T_{Reg}$  podría formar parte de los mecanismos reguladores que limitan las respuestas inmunológicas inflamatorias. Los estudios de  $T_{Reg} CD4^+CD25^+$  parecen demostrar que éstas actúan directamente sobre los linfocitos T efectores y/o indirectamente modulando las CPA. Varios autores han demostrado recientemente el concepto de que, *in vivo*, los  $T_{Reg}$  podrían proliferar en respuesta a proteínas antigénicas (Walker et al., 2003), a CDs cargadas de antígenos peptídicos (Yamazaki et al., 2003) y a antígenos organo-específicos expresados endógenamente (Fisson et al., 2003).

La expansión de los  $T_{Reg} CD4^+CD25^+$  tras la MPiv es compatible con estudios previos en pacientes con neuritis óptica y en los brotes de EM tras altas dosis de MP oral (Sellebjerg et al., 2000). Esta expansión podría también ser el resultado combinado de la evolución natural del brote de EM y del efecto de la MPiv. El posible mecanismo por el que la MPiv induce este aumento en el número de  $T_{Reg}$  ( $CD4^+CD25^+$  y  $CD4^+CD25^{+high}$ ) no se conoce. Los linfocitos T  $CD4^+CD25^+$  de ratones expresan constitutivamente niveles elevados de la molécula GITR (receptor TNF inducible por glucocorticoides) (Kanamaru et al., 2004), lo que podría hacer a los  $T_{Reg}$  células especialmente sensibles a los GC. La coestimulación vía GITR indujo la secreción de elevadas cantidades de IL-

10. La molécula GITR expresada en los T<sub>Reg</sub> parece jugar un papel crucial en el mantenimiento de la tolerancia periférica.

Actualmente se conocen otros tipos celulares, aparte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que también pueden estar mediando tolerancia, como son los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Chen et al., 1995). Esta población forma parte de los resucitados “linfocitos T CD8<sup>+</sup> supresores” no está aún bien caracterizada. No está claro si se define por la ausencia de expresión de la molécula CD28 (Najafian et al., 2003; Cortesini et al., 2001) o por la expresión de la molécula CD25 (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) (Field et al., 2003).

Los datos presentados en esta Memoria demuestran que los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> aumentaron tras la MPiv y se observó una fuerte correlación entre éstos y los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> post-MPiv. Asimismo, el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (considerados como parte de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores) era significativamente más bajo en los pacientes durante el brote que en los controles, de acuerdo con lo observado por otros grupos, en los que reportan que pacientes con enfermedades autoinmunes, entre ellas la EM, poseen niveles más bajos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> supresores en la sangre (Balashov et al., 1995; Filaci et al., 2005; Crucian et al., 1995). Recientemente, otro grupo ha demostrado que los pacientes no tratados muestran un defecto generalizado en la supresión mediada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> al compararlos con los controles sanos, y el tratamiento con acetato de glatiramer (Copaxone) induce un aumento en las respuestas T CD8<sup>+</sup> de naturaleza reguladora/supresora (Tennakoon et al., 2006).

De forma similar a los linfocitos CD4<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, tras el tratamiento con MPiv se produjo un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, perdiéndose las diferencias significativas encontradas con los controles. Esta población celular correlacionó inversamente con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> activados durante el brote e inversamente también con los T CD8<sup>+</sup> activados tras la MPiv.

Haegle y cols. encontraron niveles elevados de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria efectores (medidos según expresión CCR7<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup>) en los pacientes con EM (Haegle et al., 2007). Este grupo sugirió que los niveles elevados de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria efectores podrían reflejar mayor inflamación, lo que sería indicativo de actividad de la enfermedad en los pacientes con EM. En este estudio, no se han observado diferencias significativas en el porcentaje de estas células circulantes en los pacientes durante el

brote de EM comparado con los controles sanos. Sin embargo, sí se observó que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria efectores descendieron, aunque no significativamente, tras el tratamiento con MPiv, en paralelo con un aumento en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes.

Como resultado de todos los datos anteriores, se puede hipotetizar que los GCs podrían tener un efecto añadido sobre el desarrollo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, bloqueando su completa diferenciación y promoviendo la expansión de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores. Podría tratarse de un efecto neuroprotector de los GCs, por el cual impedirían la destrucción axonal por parte de los linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, no podemos atribuir todos estos cambios a efectos de los glucocorticoides, ya que podría tratarse también de un efecto debido al curso espontáneo del brote de EM, o, más probablemente, a una combinación de ambos mecanismos.

En conclusión, la acción de la MPiv sobre las supoblaciones de CDs circulantes, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> activados y reguladores podría tener un papel relevante en la actividad anti-inflamatoria/inmunosupresora en la fase temprana de los procesos patológicos de la EM y podría contribuir a la respuesta protectora del individuo. Aunque los resultados presentados parecen apoyar este concepto, su demostración requeriría un ensayo clínico con un grupo control con placebo, lo que no es factible por cuestiones éticas.

## 5.2. ESTUDIO OBSERVACIONAL LONGITUDINAL DE UN AÑO EN PACIENTES CON EMRR EN LOS QUE SE INICIA TRATAMIENTO CON INTERFERÓN BETA-1a

Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal, observacional, en 23 pacientes con EM en tratamiento con IFN $\beta$ -1a y se estudió la evolución de las dos subpoblaciones de CDs periféricas (mCDs y pCDs) y de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados y reguladores y los diferentes estados de diferenciación de los linfocitos T con respecto a los controles sanos. Se ha demostrado que la cohorte de pacientes con EM clínicamente estables antes de iniciar tratamiento con IFN $\beta$ -1a presentaba porcentajes significativamente más bajos de mCDs BDCA1<sup>+</sup> en sangre periférica que los controles sanos. A su vez, se observaron diferencias en el porcentaje basal de mCDs BDCA1<sup>+</sup> entre los pacientes no respondedores y los respondedores al tratamiento. Al igual que nuestro estudio, Yilmaz A y cols, encontraron un descenso significativo en el número de mCDs circulantes en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria, (la cual se cree que es de naturaleza autoinmune). Tampoco encontraron diferencias significativas en el número de pCDs circulantes entre los pacientes y los controles (Yilmaz et al., 2006).

Hay estudios previos en los que dependiendo del tipo de enfermedad inmunológica, encontraron un descenso predominantemente de las mCDs (Síndrome de Sjögren, tuberculosis y asma bronquial) (Ozaki et al., 2001; Uehira et al., 2002; Upham et al., 2002) o de las pCDs (lupus eritematoso, hepatitis B y C crónica) (Cederblad et al., 1998; Gill et al., 2002). En el lupus eritematoso, prototipo de enfermedad autoinmune, la reducción de las CDs precursoras circulantes, se correlacionó inversamente con actividad de la enfermedad (Cederblad et al., 1998; Gill et al., 2002). Se asume que en las enfermedades autoinmunes o infecciosas, la reducción de los precursores de CDs está causada por un aumento de su reclutamiento en el tejido inflamado. Sin embargo, no está claro porqué las diferentes subpoblaciones de CDs están alteradas en diferentes enfermedades inmunológicas. Este hecho podría estar relacionado con los mecanismos inmunológicos específicos de la enfermedad.

Otros autores reportaron que tanto las mCDs como las pCDs están disminuidas en pacientes con lupus. Asimismo encontraron niveles elevados de IFN- $\alpha$  sérico (marcador de inflamación) en la mayoría de los pacientes y al igual que el primer estudio de de los corticoides presentado en esta Memoria, ellos encontraron que las pCDs disminuyeron tras tratamiento esteroideo, mientras que las mCDs no se vieron afectadas por el

tratamiento (Gill et al., 2002). En el primer estudio presentado en esta memoria, las pCDs disminuyeron significativamente tras tratamiento con MPiv y las mCDs BDCA1<sup>+</sup> no se vieron afectadas numéricamente, pero sí funcionalmente, tras el tratamiento con MPiv. En el segundo estudio presentado en esta Memoria, las pCDs CD123<sup>+</sup> sufrieron un significativo y progresivo descenso en los pacientes respondedores a lo largo del tratamiento con IFN $\beta$ -1a, mientras que las mCDs BDCA1<sup>+</sup> y CD11c<sup>+</sup> aumentaron.

No se saben exactamente las causas, pero los porcentajes más bajos de las mCDs BDCA1<sup>+</sup> circulantes podrían estar relacionados con una anomalía intrínseca inmunológica en los pacientes con EM. Otra posibilidad podría ser que estas células posean un defecto cuantitativo en la expresión de marcadores, o en su estado de maduración o ambas causas. Como tercera hipótesis, los niveles disminuidos de mCDs BDCA1<sup>+</sup> circulantes en los pacientes no respondedores podrían ser causados por su reclutamiento hacia otros tejidos, incluyendo el SNC, lo cual podría ser indicador de actividad subclínica. En un estudio inmunohistoquímico reciente de autopsia cerebral y de tejido de médula espinal, aportó evidencia de que las CDs inmaduras y maduras se reclutan en las lesiones parenquimatosas y las meninges de pacientes con EM con cursos de la enfermedad con brotes y progresivos (Serafini et al., 2006). Estos autores sugieren que las CDs se reclutan y maduran en las lesiones de EM, donde pueden contribuir a la regulación local de las respuestas linfocitarias T. Un marcador que define el estado de maduración de las CDs es la expresión de proteínas CPH de clase II en superficie y de moléculas T coestimuladoras. Las CDs inmaduras generalmente expresan menos CPH de clase II y si interactúan con los linfocitos T vírgenes inducen tolerancia (Santambrogio and Strominger, 2006). El bajo número de mCDs en los pacientes con EM podría deberse a que las mCDs son menos eficientes en la regulación de la inmunidad o la tolerancia (Jonuleit et al., 2000). También podría deberse a otros mecanismos, como la apoptosis de estas células o una reducción en la producción de precursores de mCDs de la médula ósea. En otro estudio realizado por Feili-Hariri M y *col* en un modelo murino de diabetes, (en ratones con diabetes no obesa, “nonobese diabetic mouse”; ratones NOD), se encontró que las CDs derivadas de ratones NOD a partir de progenitores mieloides, eran mucho más bajas en número que las generadas a partir de progenitores mieloides de otros ratones. Asimismo, estas CDs, a pesar de presentar un fenotipo más maduro, producían menos cantidad de IL-12 p70 tras estimulación. Estos autores sugieren que los ratones NOD podrían tener un defecto cuantitativo de progenitores de CDs de médula ósea y que estos números bajos de CDs

generadas en estos ratones, podrían disminuir la capacidad de las CDs para estimular los linfocitos T reguladores.

Estudios recientes han demostrado que el fenotipo y la función de las CDs circulantes están alteradas en los pacientes con EM (Huang et al., 2001; Lopez et al., 2006). Karni y *col.* (Karni et al., 2006) encontraron que las mCDs de pacientes con EMRR y EMSP expresaban mayores niveles de la molécula coestimuladora CD40 que las mCDs de controles y en estudios funcionales, observaron que en ambos tipos de pacientes se producían mayores cantidades de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. Huang y *col.* encontraron que las CDs secretoras de citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) estaban alteradas en los pacientes con EM no tratados, con respecto a los controles (Huang et al., 1999).

Se ha relacionado las pCDs con inducción de respuestas Th2 (Rissoan et al., 1999) así como con la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores tras ser activados por oligodesoxinucleótidos CpG (Moseman et al., 2004).

Stasiolek y *col.* demostraron que las pCDs de pacientes con EM presentan un perfil más inmaduro con más baja expresión de moléculas coestimuladoras que los controles sanos. Asimismo los cultivos de pCDs mostraron un defecto en el proceso madurativo y menor secreción de IFN- $\gamma$  e IL12p70. Las pCDs de los pacientes también perdieron su capacidad de generar linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Stasiolek et al., 2006).

Por otra parte, hay estudios que sugieren la implicación de las pCDs en las respuestas antivirales y pro-inflamatorias, donde las pCDs maduras estimulan eficientemente a los linfocitos T *in vitro* y dirigen una potente polarización hacia Th1, lo cual está mediado por el efecto sinérgico de la IL-12 y los interferones de tipo I. *In vivo*, las pCDs maduras se encuentran en los órganos linfoides secundarios, donde representan la principal fuente de IFN de tipo I durante la inflamación (Cella et al., 2000). Las pCDs expresan receptores de tipo Toll (TLR7 y TLR9). Se ha demostrado que la activación de las pCDs a través de TLR induce una rápida y robusta producción de IFN de tipo I, elevados niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6, así como una variedad de quimiocinas (Cao and Liu, 2007).

En este estudio, las pCDs CD123<sup>+</sup> sufrieron un significativo y progresivo descenso en los pacientes respondedores a lo largo del tratamiento con IFN $\beta$ -1a, no siendo así en los no respondedores.

También se ha sugerido que las mCDs maduras pueden inhibir la función inmunosupresora de los T<sub>Reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Pasare and Medzhitov, 2003). Otra hipótesis

apoyada por los datos de Roncarolo *y col.* (Roncarolo et al., 2001b) es que, en el estado de equilibrio, el principal papel de los T<sub>Reg</sub> podría ser mantener las CDs en un estado inmaduro por medio del contacto celular y la secreción de citocinas como la IL-10 y TGF- $\beta$ . La IL-10 disminuye la capacidad presentadora de antígeno de numerosas CPA, incluidas las CDs derivadas de médula ósea y las células de Langerhans, lo cual podría explicar estos descubrimientos. No se puede excluir que los T<sub>Reg</sub> podrían estar actuando directamente sobre los linfocitos T efectores, compitiendo con los linfocitos T patogénicos para acceder a las CPA, o actuar directamente sobre las CPA. Por tanto, es importante comprender los procesos que regulan tanto la tolerancia como la inmunidad y su relación.

En este estudio, la probabilidad de tener un brote tras iniciar tratamiento con INF $\beta$ -1a se asoció fuertemente con un menor porcentaje basal de las mCDs circulantes. Otro grupo sugiere que la disminución de las mCDs circulantes podría predecir riesgo vascular, al encontrar una fuerte correlación inversa entre las mCDs circulantes y los niveles de proteína C reactiva y la IL-6 en la arterioesclerosis. La proteína C reactiva y la IL-6 se han considerado buenos marcadores de inflamación, y buenos predictores de futuros eventos cardiovasculares o cerebrovasculares en las enfermedades arterioescleróticas (Luc et al., 2003).

Al igual que en los datos aquí reportados, la probabilidad de tener un brote tras iniciar tratamiento con INF $\beta$ -1a se asoció fuertemente con menor porcentaje basal de mCDs BDCA1<sup>+</sup>.

Los resultados obtenidos, sugieren que el efecto del tratamiento con INF $\beta$ -1a podría ser dependiente de las mCDs BDCA1<sup>+</sup>.

Es muy importante definir un marcador seguro que prediga la respuesta clínica al tratamiento con INF $\beta$ -1a. Los niveles basales de mDCs BDCA-1<sup>+</sup> ayudan a predecir la respuesta clínica al INF $\beta$ -1a, con una especificidad y sensibilidad del 80%, con un VPN de tener un brote durante el tratamiento con INF $\beta$ -1a del 85,7% cuando el porcentaje de las mCDs es mayor del 0,4%. Asimismo, se obtuvo un riesgo relativo (*Hazard ratio*) de 7,18, es decir, los pacientes con valores basales de mCDs BDCA1<sup>+</sup> < 0,4% tienen 7,18 veces más probabilidad de tener un brote en el tiempo de seguimiento que los pacientes que poseen valores basales de mCDs BDCA1<sup>+</sup> > 0,4%.

Este sería el primer marcador biológico que permitiría predecir la respuesta clínica al INF $\beta$ -1a. Sin embargo, debido al pequeño número de pacientes de la cohorte aquí

estudiada, sería necesario confirmar nuestros resultados en series más amplias de pacientes.

Como ya se ha mencionado previamente, las CD se han relacionado con la inmunopatogénesis de la EM y se ha demostrado la presencia de las mCDs y pCDs en el LCR de los pacientes con EM (de Andrés C, 2000; De Andrés et al., 2000; Pashenkov et al., 2001a; Pashenkov et al., 2001b). Se conocen bien los tres estados de diferenciación de las CD y su típica ruta migratoria (Banchereau et al., 2000; Bobryshev and Lord, 1998). Las CD derivan de un progenitor hematopoyético ( $CD34^+$ ) común de la médula osea y se liberan a la sangre como CD precursoras circulantes. Del corriente sanguíneo, entran en varios tejidos y se convierten en CD inmaduras residentes de tejidos, las cuales son capaces de capturar antígenos. En respuesta a señales inflamatorias, se induce su maduración, lo cual les permite activar a los linfocitos T tras su migración a los nódulos linfáticos. Dependiendo de las citocinas presentes en su ambiente local, las CD inmaduras residentes de tejidos, alternativamente pueden derivarse a partir de monocitos. Hay estudios que reportan el aumento local de CD residentes de tejidos en las lesiones inflamatorias, acompañado de un descenso de CD precursoras circulantes, indicando un reclutamiento de estas células de la sangre al tejido inflamado (Ota et al., 2004; Kunitani et al., 2002; Uehira et al., 2002).

Con respecto al porcentaje de los linfocitos T  $CD4^+$  reguladores, al igual que otros autores, se vio que la expresión de CD25 en los linfocitos T  $CD4^+$  de sangre periférica, estaba más elevada en pacientes con EM en actividad clínica (estudio corticoides) con respecto a los controles (Khoury et al., 2000; Navarro et al., 2006). Sin embargo, al igual que otros estudios, en los pacientes con EM, en situación estable al inicio del estudio, no había diferencias significativas en los porcentajes basales de linfocitos T  $CD4^+$  reguladores con respecto a los controles (Putheti et al., 2004; Feger et al., 2007). Sin embargo, Kumar y col (Kumar et al., 2006) encontraron un significativo aumento en los linfocitos T  $CD4^+$  reguladores de sangre periférica de los pacientes con EM no activos clínicamente con respecto a los controles. Una explicación podría ser los diferentes grupos de pacientes con EM analizados. Además, estos autores incluyeron 25 pacientes con EMRR y 10 pacientes con EMSP, mientras que todos los pacientes de esta Memoria fueron EMRR. De forma llamativa, los pacientes respondedores al tratamiento presentaban mayor porcentaje de linfocitos T  $CD4^+$  reguladores con respecto a los controles y los pacientes no respondedores.



En ambos grupos de pacientes con EM (respondedores y no respondedores) antes del tratamiento con IFN- $\beta$ , se confirmó, al igual que otros autores (de Andres et al., 2007), un descenso significativo en la actividad supresora de los T<sub>Reg</sub> (Baecher-Allan et al., 2004; Viglietta et al., 2004).

Con respecto a la evolución en el número y función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores durante 1 año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a, se observó un aumento significativo en el porcentaje de estas células, así como una recuperación progresiva de la función supresora defectuosa de los T<sub>Reg</sub>, tal y como nuestro grupo ya publicó a mes 6 de tratamiento (de Andres et al., 2007).

Con respecto a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores, al igual que lo reportado por otros grupos (Crucian et al., 1995) y al igual que ocurría en el primer estudio de los pacientes con EM en brote, antes de iniciar tratamiento con MPiv, se encontraron niveles basales significativamente más bajos de estas células en los 23 pacientes estables con EM comparados con los controles sanos.

De forma similar a lo que ocurría con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores, el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) aumentó significativamente tras 1 año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a. Se necesitan estudios posteriores para confirmar si el IFN $\beta$ -1a no sólo restaura o aumenta el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores, sino si también restaura la función reguladora de estas células, al igual que ocurre en pacientes tratados con acetato de glatiramer (Copaxone) (Tennakoon et al., 2006).

Los brotes y la progresión son dos fenómenos clínicos básicos de la EM. Los brotes son considerados como la expresión clínica de la inflamación en el SNC. La fase progresiva de la enfermedad se define por un aumento clínico progresivo de discapacidad con presencia o no de brotes. Se ha demostrado que hay daño axonal focal relacionado con la inflamación y que podría contribuir a la discapacidad irreversible, pero que también podría ocurrir neurodegeneración posterior independiente y progresión a discapacidad (Bajartmar et al., 2002; Bruck, 2005). Los cambios en la tasa de brotes anual y en la RMN han sido las medidas realizadas en la mayoría de ensayos clínicos para testar la eficacia de los fármacos creados para la EMRR, entre ellos el IFN $\beta$ -1a. Medir la discapacidad por EDSS también ha sido empleado en estudios de tratamientos aprobados y que son clínicamente relevantes (1998; Comi et al., 2001; Gasperini et al., 2002; Paty and Li, 1993). El IFN $\beta$ -1a es principalmente un fármaco inmunomodulador

(Dhib-Jalbut, 2002) y sus efectos en los parámetros clínicos e inmunológicos podrían ser detectados de forma temprana. En este estudio, durante el primer año de tratamiento, se observó que al igual que otros estudios clínicos (Panitch et al., 2005) el 39,13% de los pacientes eran no respondedores clínicos; 8 pacientes tuvieron brotes, en uno de ellos se observó un aumento persistente de la discapacidad (EDSS) tras el brote, y otro paciente progresó a EMSP durante el primer año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a. Aunque con las limitaciones de los pocos casos de nuestra serie, se observó que los pacientes no respondedores fueron mayores en edad que los respondedores, al igual que ocurre en estudios previos donde los no respondedores eran mayores y presentaban mayor duración de la enfermedad en el momento del tratamiento con IFN $\beta$ -1a (Waubant et al., 2003). No se sabe si a ello contribuyen los cambios hormonales o inmunológicos por la edad (Shodell and Siegal, 2002). Otros autores (Rio et al., 2006) observaron que la confirmación temprana del aumento de la discapacidad podría ser un marcador clínico temprano de escasa respuesta al IFN $\beta$ -1a en pacientes con EMRR.

Las razones de la escasa respuesta al IFN $\beta$ -1a son complejas y no están claras, pero podrían reflejar la heterogeneidad en la patogénesis de la EM, particularmente el fondo genético y las diferencias biológicas, diferentes grados de actividad de la enfermedad durante el tratamiento y/o diferentes efectos del tratamiento en las células inmunológicas o en el resto de células de otros tejidos. (Fukazawa et al., 2004; Sturzebecher et al., 2003). Sin embargo, en nuestra serie no se puede excluir el potencial efecto de los anticuerpos neutralizantes de IFN $\beta$ -1a en los pacientes no respondedores, aunque la duración del seguimiento fue bastante limitada como para detectar un efecto de los anticuerpos neutralizantes en las medidas clínicas (Francis et al., 2005; Panitch et al., 2005). Un biomarcador permitiría identificar en el estudio basal a los respondedores al IFN $\beta$ -1a. Sin embargo, hasta la actualidad no existe ningún marcador biológico que objetivamente evalúe los procesos patogénicos o sirva para predecir y monitorizar el efecto farmacológico del tratamiento inmunomodulador en la EM. Con respecto a la identificación de biomarcadores que predigan respuesta clínica al tratamiento con IFN $\beta$ -1a, hay diversos estudios. Entre ellos, se encuentran estudios genéticos que descubrieron asociación entre los microsatélites polimórficos localizados en el primer intrón del gen del IFN $\beta$  y los pacientes no respondedores (presencia de brotes) (Martinez et al., 2006). En un estudio hallaron un descenso significativo en la expresión de los receptores del Interferón, IFNAR1 e IFNAR2, en los pacientes respondedores al

compararlos con los no respondedores (Oliver et al., 2007). Otros autores encontraron niveles bajos de IFN- $\gamma$  en los pacientes respondedores a lo largo del tratamiento (Petereit et al., 2002), o una desviación del perfil de citocinas hacia Th2 (Mei et al., 2006), expresión disminuida de VLA-4 en los linfocitos T (Soilu-Hanninen et al., 2005), o niveles basales de mRNA de la IL-12p35 más bajos en los respondedores comparados con los no respondedores. En este último ejemplo, este marcador predijo la evolución clínica en el 81% de 26 pacientes (van Boxel-Dezaire et al., 2000; KILLESTEIN ET AL., 2002). Killestein J y *col.*, correlacionaron el nivel de proliferación linfocitaria basal frente a mitógenos en los pacientes con EM, con la eficacia del tratamiento con IFN $\beta$ . Encontraron una probabilidad del 88% (95% IC, 71-95%) de respuesta favorable al IFN $\beta$  en pacientes con elevada respuesta linfoproliferativa basal frente a fitohemaglutinina, mientras que se obtuvo sólo un 16% de respuesta favorable al tratamiento en los pacientes con más baja respuesta linfoproliferativa basal (95% IC, 7-33%).

Los linfocitos T $\gamma\delta^+$  se encuentran de forma elevada en las lesiones cerebrales de la EM y se ha postulado que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Murzenok et al., 2002). Se encontraron niveles aumentados de estas células, aunque no de forma significativa, en los pacientes con EM comparados con los controles y se observó un descenso en su porcentaje tras tratamiento con IFN $\beta$ -1a. El aumento observado tras tratamiento con IFN $\beta$ -1a en el porcentaje de los linfocitos T reguladores podría explicar el descenso en el porcentaje de los linfocitos T CD8 $^+$ TCR $\gamma\delta^+$ . Una posible explicación podría ser que los linfocitos T reguladores estuvieran inhibiendo o controlando la proliferación de estos linfocitos T con posible actividad patogénica.

Samantha Jilek y *col.* estudiaron un grupo de pacientes con sospecha de EM de forma temprana tras la aparición de la enfermedad y estudiando en LCR los linfocitos T CD4 $^+$  y T CD8 $^+$  altamente diferenciados, encontraron que estas células tenían un papel relevante en los estados tempranos de la EMRR (Jilek et al., 2007). Encontraron un mayor enriquecimiento de los linfocitos T CD8 $^+$  altamente diferenciados frente a los linfocitos T CD4 $^+$  altamente diferenciados en los pacientes con EMRR, así como un mayor número de linfocitos T CD8 $^+$  altamente diferenciados que en los pacientes con EMPP o en pacientes con otras enfermedades neurológicas. En los datos aquí aportados, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de las diferentes subpoblaciones periféricas de linfocitos T CD4 $^+$  estudiadas (vírgenes, memoria central y

memoria efectores) en los pacientes comparándolos con controles sanos, ni entre los dos grupos de pacientes, respondedores y no respondedores. Sin embargo, se encontraron mayores niveles de linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores en sangre en los pacientes no respondedores frente a los respondedores, aunque la diferencia no era significativa. Asimismo, se observó una tendencia a mayores niveles basales de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria en los pacientes con EM al compararlos con los controles. El tratamiento con IFNβ-1a podría estar controlando la activación inmunológica sistémica en los pacientes con EM al reducir el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup> patogénicos, aumentando los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> reguladores.

Estudiando los efectos del tratamiento en los niveles séricos de citocinas se observó un aumento en los niveles de IL-10 al año de tratamiento, siendo este aumento significativo en los pacientes respondedores. La IL-10 tiene múltiples efectos que pueden ser beneficiosos en la EM, entre ellos cabría destacar la inhibición de la proliferación de los linfocitos T y la producción de IL-1 y TNF-α por los macrófagos (Imitola et al., 2005). La IL-10 también puede inducir anergia en los linfocitos T y producir linfocitos T reguladores (Groux et al., 1996; Roncarolo et al., 2001a). Las CDs inmaduras expuestas a IL-10 no maduran en respuesta a LPS (Adikari et al., 2004). Dependiendo de la vía y el tiempo de administración, la IL-10 puede reducir la severidad de la EAE y los ratones deficientes en IL-10 desarrollan enfermedad más severa (Rott et al., 1994; Cua et al., 1999; Beebe et al., 2002; Bettelli et al., 1998). Asimismo, la IL-10 reduce la expresión del ARNm de IL-12p40 en monocitos humanos (D'Andrea et al., 1993). Graber y col., reportaron recientemente que los niveles de IL-10 estaban disminuidos en los pacientes no respondedores al tratamiento con IFNβ (Graber et al., 2007). De forma similar a lo reportado en esta memoria, otros grupos observaron que el tratamiento con IFNβ aumentaba la producción celular de IL-10 y la relación IL-10/IL-12.

En resumen, estos datos indican claramente lo siguiente: En primer lugar, en el estudio basal, se encontró un significativo descenso en el porcentaje de mCDs circulantes en los pacientes con EM con respecto a los controles, lo cual junto a previos estudios que describen alteraciones en el número de CDs en enfermedades autoinmunes o infecciosas, explicaría que la reducción de las mCDs circulantes podría estar causada por un aumento de su reclutamiento en el tejido inflamado, en este caso en el SNC; o bien podría tratarse de un defecto intrínseco en el número de estas células en situación de remisión clínica. En segundo lugar, el porcentaje basal de mCDs podría ser predictivo

de respuesta clínica al IFN $\beta$ -1a a 1 año de tratamiento, con una especificidad y sensibilidad del 80%. Además, se encontró mayor porcentaje basal de linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores en los pacientes respondedores con respecto a los no respondedores y a los controles, lo cual podría ser indicativo de un diferente estado fisiopatogénico en ambos grupos de pacientes. En tercer lugar, se observó un significativo descenso en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores en los pacientes comparados con los controles, lo cual está reportado también por otros grupos y al igual que ocurre con los T CD4<sup>+</sup> reguladores, se encontró un mayor porcentaje basal de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores en los pacientes respondedores con respecto a los no respondedores.

En cuarto lugar, estos resultados confirman previos datos de este grupo ya publicados, acerca del papel beneficioso del IFN $\beta$ -1a al aumentar el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> reguladores y la función de los T<sub>Reg</sub> en los pacientes con EM repondedores y no respondedores, tras 1 año de tratamiento. Además, a 1 año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a, el número de las mCDs aumentó en los 23 pacientes hasta alcanzar valores similares a los encontrados en los controles sanos (se perdieron las diferencias significativas encontradas en el estudio basal con los controles). Sin embargo, en los pacientes respondedores las pCDs descendieron. Además los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria, descendieron significativamente tras 1 año de tratamiento con IFN $\beta$ -1a, lo cual podría ser reflejo de que el tratamiento con IFN $\beta$ -1a podría estar controlando la activación inmunológica sistémica en los pacientes con EM.

También se observó un aumento en los niveles séricos de IL-10 tras 1 año de tratamiento, lo cual se relacionó con buena respuesta clínica al tratamiento en los pacientes respondedores.

Globalmente, estos datos reportan los diferentes efectos inmunomoduladores del IFN $\beta$ -1a en las células estudiadas y sus diferentes efectos en los pacientes con EM. El desarrollo de biomarcadores es esencial para comprender mejor la patogénesis de la enfermedad y para maximizar el desarrollo de un tratamiento individualizado para la EM de forma temprana.

Un mayor conocimiento de las reglas que gobiernan la relación entre los T<sub>Reg</sub>-CDs podría ayudarnos a comprender mejor la respuesta inmunológica en los pacientes con EM. Es necesario investigar las implicaciones clínicas de estos hallazgos en una serie más amplia de pacientes y la observación clínica de la respuesta de los pacientes con EM a más largo plazo.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Durante el brote, los pacientes con EM mostraron porcentajes de T<sub>Reg</sub> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+high</sup>) más elevados que los controles sanos. Esta expansión de T<sub>Reg</sub> podría formar parte de los mecanismos reguladores que protegen frente a las respuestas autoinmunes efectoras e inflamatorias.
2. En los pacientes estables con EM se observó un descenso significativo en el porcentaje de mCDs circulantes con respecto a los controles.
3. En situación de remisión clínica los pacientes con EM presentaron porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> reguladores más bajos que los controles sanos.
4. Se demostró un defecto en la función reguladora de los T<sub>Reg</sub> de los pacientes con EM en el estudio basal al compararlos con los controles sanos. La función supresora de las células T CD4<sup>+</sup> reguladoras se incrementó significativamente a partir de los 6 meses de tratamiento con IFN $\beta$ .
5. Tras tratamiento con metilprednisolona durante el brote clínico de EM, se observó un descenso significativo de las células dendríticas plasmacitoides y mieloides y de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados y un aumento significativo de las células T CD4<sup>+</sup> reguladoras.
6. *In vitro*, la MP bloquea la maduración de las células dendríticas, induciendo un fenotipo tolerogénico (baja expresión de CD11c, HLA-DR y CD40).
7. El porcentaje basal de las células dendríticas mieloides BDCA1<sup>+</sup> podría ser el primer biomarcador predictivo de respuesta clínica al IFN $\beta$ -1a tras 1 año de tratamiento, con una especificidad y sensibilidad del 80%. Pacientes con un valor basal de mCDs BDCA1<sup>+</sup> menor del 0,4% tienen 7,14 veces más probabilidad de desarrollar actividad clínica de esclerosis múltiple frente a pacientes con un valor basal mayor del 0,4%.
8. Tras 1 año de tratamiento con Rebif44, se observó un aumento significativo de las células dendríticas mieloides BDCA1<sup>+</sup> hasta alcanzar los valores de los controles sanos, y un descenso significativo de las células dendríticas plasmacitoides en los pacientes respondedores al IFN $\beta$ .
9. Tras 1 año de tratamiento con Rebif44, el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> reguladores aumentó significativamente.
10. Tras 1 año de tratamiento con Rebif44, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria descendieron significativamente, lo cual podría reflejar que el tratamiento con IFN $\beta$ -1a podría estar controlando la activación inmunológica sistémica en los pacientes con EM.

11. Los niveles séricos de IL-10 aumentaron al año de tratamiento con IFN $\beta$ , siendo este aumento significativo en los pacientes respondedores.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1998. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet* 352, 1498-1504.
- Achiron, A., Gabbay, U., Gilad, R., Hassin-Baer, S., Barak, Y., Gornish, M., Elizur, A., Goldhammer, Y., Sarova-Pinhas, I., 1998. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis. Effect on relapses. *Neurology* 50, 398-402.
- Adikari, S.B., Pettersson, A., Soderstrom, M., Huang, Y.M., Link, H., 2004. Interleukin-10-modulated immature dendritic cells control the proinflammatory environment in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 59, 600-606.
- Alvarez, R., 1995. Estadística no paramétrica. El procedimiento Npar. In: Santos Dd, ed. *Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS.*, Madrid, pp. 305-382.
- Andersson, M., Alvarez-Cermeno, J., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L.M., Gronning, M., et al., 1994. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 897-902.
- Andersson, P.B., Goodkin, D.E., 1998. Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review. *J Neurol Sci* 160, 16-25.
- Armitage, P., Berry, G., 1992a. Análisis de Supervivencia. In: Doyma, ed. *Estadística para la investigación Biomédica*, Barcelona, pp. 493-515.
- Armitage, P., Berry, G., 1992b. Comparación de varios grupos. In: Doyma, ed. *Estadística para la investigación Biomédica*, Barcelona, pp. 217-249.
- Armitage, P., Berry, G., 1992c. Métodos no paramétricos. In: Doyma, ed. *Estadística para la investigación Biomédica*, Barcelona, pp. 477-492.
- Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., Hafler, D.A., 2001. CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V., Hafler, D.A., 2004. Human CD4+CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Semin Immunol* 16, 89-98.
- Bajartmar, C., Wujek, J., Trap, B., 2002. Axonal loss in pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of disease. *J Neurol Sci* 206, 165-171.
- Balashov, K.E., Khoury, S.J., Hafler, D.A., Weiner, H.L., 1995. Inhibition of T cell responses by activated human CD8<sup>+</sup> T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest* 95, 2711-2719.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Beebe, A.M., Cua, D.J., de Waal Malefyt, R., 2002. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 403-412.
- Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G., Gil, J., 1998. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 100, 142-146.
- Bendriss-Vermare, N., Barthelemy, C., Durand, I., Bruand, C., Dezutter-Dambuyant, C., Moulian, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G., Briere, F., 2001. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 107, 835-844.

- Benito, J.M., Zabay, J.M., Gil, J., Bermejo, M., Escudero, A., Sanchez, E., Fernandez-Cruz, E., 1997. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 14, 128-135.
- Berthelot, J.M., Maugars, Y., 2004. Role for suppressor T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases (including rheumatoid arthritis). *Facts and hypotheses. Joint Bone Spine* 71, 374-380.
- Bettelli, E., Das, M.P., Howard, E.D., Weiner, H.L., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., 1998. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* 161, 3299-3306.
- Biernacki, K., Antel, J.P., Blain, M., Narayanan, S., Arnold, D.L., Prat, A., 2005. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62, 563-568.
- Birbaum, G.A., J., 1998. The immunology of multiple sclerosis. Malden: Blackwell. *Clinical immunology.*, 105-115.
- Bitsch, A., Bahner, D., Wachter, C., Elitok, E., Bogumil, T., Dressel, A., Polak, T., Tumani, H., Weber, F., Poser, S., Kitze, B., 2004. Interferon beta-1b modulates serum sVCAM-1 levels in primary progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 110, 386-392.
- Bobryshev, Y.V., Lord, R.S., 1998. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc Res* 37, 799-810.
- Bornstein, M.B., Miller, A., Slagle, S., Weitzman, M., Crystal, H., Drexler, E., Keilson, M., Merriam, A., Wassertheil-Smoller, S., Spada, V., et al., 1987. A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 317, 408-414.
- Bruck, W., 2005. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J Neurol* 252 Suppl 5, v3-v9.
- Bruder, D., Probst-Keppler, M., Westendorf, A., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34, 623-630.
- Bryant, J., Clegg, A., Milne, R., 2001. Systematic review of immunomodulatory drugs for the treatment of people with multiple sclerosis: Is there good quality evidence on effectiveness and cost? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70, 574-579.
- Calabresi, P.A., Tranquill, L.R., Dambrosia, J.M., Stone, L.A., Maloni, H., Bash, C.N., Frank, J.A., McFarland, H.F., 1997. Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Ann Neurol* 41, 669-674.
- Canning, M.O., Grotenhuis, K., de Wit, H.J., Drexhage, H.A., 2000. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Endocrinol* 143, 687-695.
- Cao, W., Liu, Y.J., 2007. Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 19, 24-30.
- Carrasco, J.L., Hernán, M.A., 1993a. Análisis de Regresión Lineal. In: *Ciencia 3 SL*, ed. *Estadística Multivariante en las Ciencias de la Vida*, Madrid, pp. 153-196.
- Carrasco, J.L., Hernán, M.A., 1993b. Análisis de Regresión Logística. In: *Ciencia 3 SL*, ed. *Estadística Multivariante en las Ciencias de la Vida*, Madrid, pp. 197-246.
- Carretero Ares, J., Bowakim Dib, W., Acebes Rey, J.M., 2001. Actualización: esclerosis múltiple. *Medifam* 11, 516-529.

- Cederblad, B., Blomberg, S., Vallin, H., Perers, A., Alm, G.V., Ronnblom, L., 1998. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha- producing cells. *J Autoimmun* 11, 465-470.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., Colonna, M., 2000. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1, 305-310.
- Chan, A., Weilbach, F.X., Toyka, K.V., Gold, R., 2005. Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 139, 152-158.
- Chen, Y., Inobe, J., Weiner, H.L., 1995. Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. *J Immunol* 155, 910-916.
- Comi, G., Colombo, B., 2000. Starting disease modifying treatment in MS. *Int. MSJ* 7, 55-61.
- Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Durelli, L., Edan, G., Fernandez, O., Hartung, H., Seeldrayers, P., Sorensen, P.S., Rovaris, M., Martinelli, V., Hommes, O.R., 2001. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 357, 1576-1582.
- Compston, A., Coles, A., 2002. Multiple sclerosis. *Lancet* 359, 1221-1231.
- Compston, A., 1990. Risk factors for multiple sclerosis: race or place. *J Neurol Neurosurg. Psychiatry* 53, 821-823.
- Corrigan, C.J., Hamid, Q., North, J., Barkans, J., Moqbel, R., Durham, S., Gemou-Engesaeth, V., Kay, A.B., 1995. Peripheral blood CD4 but not CD8 t-lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2-type pattern: effect of glucocorticoid therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12, 567-578.
- Cortesini, R., LeMaout, J., Ciubotariu, R., Cortesini, N.S., 2001. CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol Rev* 182, 201-206.
- Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarlasci, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2003. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 102, 4107-4114.
- Cottrell, D.A., Kremenutzky, M., Rice, G.P., Hader, W., Baskerville, J., Ebers, G.C., 1999. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 6. Applications to planning and interpretation of clinical therapeutic trials in primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 122 ( Pt 4), 641-647.
- Cottrez, F., Groux, H., 2004. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 77, S12-15.
- Crucian, B., Dunne, P., Friedman, H., Ragsdale, R., Pross, S., Widen, R., 1995. Alterations in levels of CD28-/CD8+ suppressor cell precursor and CD45RO+/CD4+ memory T lymphocytes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 249-252.
- Cua, D.J., Groux, H., Hinton, D.R., Stohlman, S.A., Coffman, R.L., 1999. Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 189, 1005-1010.
- Dalakas, M.C., 1997. Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases. *Ann Intern Med* 126, 721-730.

- Dale, R.C., de Sousa, C., Chong, W.K., Cox, T.C., Harding, B., Neville, B.G., 2000. Acute disseminated encephalomyelitis, multiphasic disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis in children. *Brain* 123 Pt 12, 2407-2422.
- D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., Trinchieri, G., 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178, 1041-1048.
- de Andres, C., Aristimuno, C., de Las Heras, V., Martinez-Gines, M.L., Bartolome, M., Arroyo, R., Navarro, J., Gimenez-Roldan, S., Fernandez-Cruz, E., Sanchez-Ramon, S., 2007. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 182, 204-211.
- De Andrés, C., Aristimuño, C., Martínez-Ginés, M.L., De las Heras, V., Giménez-Roldán, S., Fernández-Cruz, E., Sánchez-Ramón, S., 2004. Longitudinal Study of the In Vivo Effects of beta-Interferon-1a on Dendritic Cells' Subsets and Regulatory T-cells in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients., Congress of the ECTRIMS, Viena.
- de Andres, C., Rodriguez-Sainz, M.C., Munoz-Fernandez, M.A., Lopez-Lazareno, N., Rodriguez-Mahou, M., Vicente, A., Fernandez-Cruz, E., Sanchez-Ramon, S., 2004. Short-term sequential analysis of sex hormones and helper T cells type 1 (Th1) and helper T cells type 2 (Th2) cytokines during and after multiple sclerosis relapse. *Eur Cytokine Netw* 15, 197-202.
- de Andrés C, V.A., Sánchez-Ramón S, Sacedón R, Gutierrez C, Zapata A., 2000. High numbers of activated dendritic cells in blood and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Rev Neurol (Paris)* 156, 3S89.
- De Andrés, C., Vicente, A., Sánchez-Ramón, S., Sacedón, R., Gutiérrez, C., Zapata, A., 2000. High numbers of activated dendritic cells in blood and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. In: ECTRIMS (Ed).
- de Jong, E.C., Vieira, P.L., Kalinski, P., Kapsenberg, M.L., 1999. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol* 66, 201-204.
- de la Rosa, G., Longo, N., Rodriguez-Fernandez, J.L., Puig-Kroger, A., Pineda, A., Corbi, A.L., Sanchez-Mateos, P., 2003. Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *J Leukoc Biol* 73, 639-649.
- Dean, G., Grimaldi, G., Kelly, R., Karhausen, L., 1979. Multiple sclerosis in southern Europe. I: Prevalence in Sicily in 1975. *J Epidemiol Community Health* 33, 107-110.
- Dhib-Jalbut, S., 2002. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 58, S3-9.
- Ebers, G.C., Kukay, K., Bulman, D.E., Sadovnick, A.D., Rice, G., Anderson, C., Armstrong, H., Cousin, K., Bell, R.B., Hader, W., Paty, D.W., Hashimoto, S., Oger, J., Duquette, P., Warren, S., Gray, T., O'Connor, P., Nath, A., Auty, A., Metz, L., Francis, G., Paulseth, J.E., Murray, T.J., Pryse-Phillips, W., Nelson, R., Freedman, M., Brunet, D., Bouchard, J.P., Hinds, D., Risch, N., 1996. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 13, 472-476.
- ECTRIMS, t.A.-t., 2002. Second look at ESIMS results. 7th ACTRIMS-18th ECTRIMS. European Charcot Foundation.

- Edan, G., Miller, D., Clanet, M., Confavreux, C., Lyon-Caen, O., Lubetzki, C., Brochet, B., Berry, I., Rolland, Y., Froment, J.C., Cabanis, E., Iba-Zizen, M.T., Gandon, J.M., Lai, H.M., Moseley, I., Sabouraud, O., 1997. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62, 112-118.
- Fazekas, F., Deisenhammer, F., Strasser-Fuchs, S., Nahler, G., Mamoli, B., 1997. Randomised placebo-controlled trial of monthly intravenous immunoglobulin therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. Austrian Immunoglobulin in Multiple Sclerosis Study Group. *Lancet* 349, 589-593.
- Feger, U., Luther, C., Poeschel, S., Melms, A., Tolosa, E., Wiendl, H., 2007. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 147, 412-418.
- Fehervari, Z., Sakaguchi, S., 2004a. CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 114, 1209-1217.
- Fehervari, Z., Sakaguchi, S., 2004b. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 16, 203-208.
- Ferguson, B., Matyszak, M.K., Esiri, M.M., Perry, V.H., 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 ( Pt 3), 393-399.
- Fernandez, O., 2007. Combination therapy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 259, 95-103.
- Fernández, O., 1990. La esclerosis múltiple en la provincia de Málaga. Tesis doctoral.
- Fernández, O., 2005. Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y esclerosis múltiple. In: Clamagirand, C.P. (Ed.), *Tratado de Medicina Interna Vol. I*, Ed Ariel, S.A., Madrid, pp. 1883-1886.
- Field, A.C., Bloch, M.F., Bellon, B., 2003. Neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmune disease generates CD8(+)Tc1 regulatory cells. *J Autoimmun* 21, 201-212.
- Filaci, G., Rizzi, M., Setti, M., Fenoglio, D., Fravega, M., Basso, M., Ansaldi, G., Ceppa, P., Borgonovo, G., Murdaca, G., Ferrera, F., Picciotto, A., Fiocca, R., Torre, G., Indiveri, F., 2005. Non-antigen-specific CD8(+) T suppressor lymphocytes in diseases characterized by chronic immune responses and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1050, 115-123.
- Filippi, M., Rocca, M.A., Martino, G., Horsfield, M.A., Comi, G., 1998. Magnetization transfer changes in the normal appearing white matter precede the appearance of enhancing lesions in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 43, 809-814.
- Filippi, M., Yousry, T., Campi, A., Kandziora, C., Colombo, B., Voltz, R., Martinelli, V., Spuler, S., Bressi, S., Scotti, G., Comi, G., 1996. Comparison of triple dose versus standard dose gadolinium-DTPA for detection of MRI enhancing lesions in patients with MS. *Neurology* 46, 379-384.
- Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., Salomon, B.L., 2003. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198, 737-746.
- Fox, R.J., Dunitz, M., 2003. Treatment of Multiple Sclerosis with Methylprednisolone. Fox RJ, K.R., 2003. Treatment of multiple sclerosis with methylprednisolone. MD Martin Dunitz, London and New York.
- Francis, G., Evans, A., Panitch, H., 1997. MRI results of a phase II trial of oral myelin in relapsing-remitting multiple sclerosis. 12th Annual Meeting of the American Neurological Association, San Diego VA.

- Francis, G.S., Rice, G.P., Alsop, J.C., 2005. Interferon beta-1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. *Neurology* 65, 48-55.
- Frank, J.A., Richert, N., Bash, C., Stone, L., Calabresi, P.A., Lewis, B., Stone, R., Howard, T., McFarland, H.F., 2004. Interferon-beta-1b slows progression of atrophy in RRMS: Three-year follow-up in NAb- and NAb+ patients. *Neurology* 62, 719-725.
- Frey, B.M., Hackett, N.R., Bergelson, J.M., Finberg, R., Crystal, R.G., Moore, M.A., Rafii, S., 1998. High-efficiency gene transfer into ex vivo expanded human hematopoietic progenitors and precursor cells by adenovirus vectors. *Blood* 91, 2781-2792.
- Fridkis-Hareli, M., Strominger, J.L., 1998. Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. *J Immunol* 160, 4386-4397.
- Fridkis-Hareli, M., Teitelbaum, D., Arnon, R., Sela, M., 1995. Synthetic copolymer 1 and myelin basic protein do not require processing prior to binding to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells. *Cell Immunol* 163, 229-236.
- Fuchsberger, M., Hochrein, H., O'Keeffe, M., 2005. Activation of plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 83, 571-577.
- Fukazawa, T., Kikuchi, S., Niino, M., Yabe, I., Miyagishi, R., Fukaura, H., Hamada, T., Tashiro, K., Sasaki, H., 2004. Attack-related severity: a key factor in understanding the spectrum of idiopathic inflammatory demyelinating disorders. *J Neurol Sci* 225, 71-78.
- Galy, A., Christopherson, I., Ferlazzo, G., Liu, G., Spits, H., Georgopoulos, K., 2000. Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells. *Blood* 95, 128-137.
- Gasparini, C., Paolillo, A., Giugni, E., Galgani, S., Bagnato, F., Mainero, C., Onesti, E., Bastianello, S., Pozzilli, C., 2002. MRI brain volume changes in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1a. *Mult Scler* 8, 119-123.
- Gill, M.A., Blanco, P., Arce, E., Pascual, V., Banchereau, J., Palucka, A.K., 2002. Blood dendritic cells and DC-poietins in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 63, 1172-1180.
- Gold, D.P., Smith, R.A., Golding, A.B., Morgan, E.E., Dafashy, T., Nelson, J., Smith, L., Diveley, J., Laxer, J.A., Richieri, S.P., Carlo, D.J., Brostoff, S.W., Wilson, D.B., 1997. Results of a phase I clinical trial of a T-cell receptor vaccine in patients with multiple sclerosis. II. Comparative analysis of TCR utilization in CSF T-cell populations before and after vaccination with a TCRV beta 6 CDR2 peptide. *J Neuroimmunol* 76, 29-38.
- Goodin, D.S., Frohman, E.M., Garmany, G.P., Jr., Halper, J., Likosky, W.H., Lublin, F.D., Silberberg, D.H., Stuart, W.H., van den Noort, S., 2002. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 58, 169-178.
- Goodkin, D.E., Shulman, M., Winkelhake, J., Waubant, E., Andersson, P., Stewart, T., Nelson, S., Fischbein, N., Coyle, P.K., Frohman, E., Jacobs, L., Holcenberg, J., Lee, M., Mocci, S., 2000. A phase I trial of solubilized DR2:MBP84-102 (AG284) in multiple sclerosis. *Neurology* 54, 1414-1420.
- Graber, J.J., Ford, D., Zhan, M., Francis, G., Panitch, H., Dhib-Jalbut, S., 2007. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis:

- correlations with interferon dose and MRI response. *J Neuroimmunol* 185, 168-174.
- Gran, B., Tranquill, L.R., Chen, M., Bielekova, B., Zhou, W., Dhib-Jalbut, S., Martin, R., 2000. Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology* 55, 1704-1714.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., Ley, T.J., 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21, 589-601.
- Group, T.C.C.M.S.S., 1991. The Canadian cooperative trial of cyclophosphamide and plasma exchange in progressive multiple sclerosis. The Canadian Cooperative Multiple Sclerosis Study Group. *Lancet* 337, 441-446.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E., Roncarolo, M.G., 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184, 19-29.
- Haeghele, K.F., Stueckle, C.A., Malin, J.P., Sindern, E., 2007. Increase of CD8+ T-effector memory cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to healthy controls. *J Neuroimmunol* 183, 168-174.
- Hafler, D.A., 2004. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 113, 788-794.
- Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I.W., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., Ivinson, A.J., Pericak-Vance, M.A., Gregory, S.G., Rioux, J.D., McCauley, J.L., Haines, J.L., Barcellos, L.F., Cree, B., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 2007. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *New England Journal of Medicine* 357.
- Hafler, D.A., Slavik, J.M., Anderson, D.E., O'Connor, K.C., De Jager, P., Baecher-Allan, C., 2005. Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204, 208-231.
- Hanley, J.A., McNeil, B.J., 1982. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29-36.
- Hardmeier, M., Wagenpfeil, S., Freitag, P., Fisher, E., Rudick, R.A., Kooijmans, M., Clanet, M., Radue, E.W., Kappos, L., 2005. Rate of brain atrophy in relapsing MS decreases during treatment with IFNbeta-1a. *Neurology* 64, 236-240.
- Hohlfeld, R., Wekerle, H., 2005. Drug insight: using monoclonal antibodies to treat multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 1, 34-44.
- Hori, S., Sakaguchi, S., 2004. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 6, 745-751.
- Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., Powell, J.D., Pardoll, D.M., Drake, C.G., Vignali, D.A., 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21, 503-513.
- Huang, Y.M., Kouwenhoven, M., Jin, Y.P., Press, R., Huang, W.X., Link, H., 2001. Dendritic cells derived from patients with multiple sclerosis show high CD1a and low CD86 expression. *Mult Scler* 7, 95-99.
- Huang, Y.M., Xiao, B.G., Ozenci, V., Kouwenhoven, M., Teleshova, N., Fredrikson, S., Link, H., 1999. Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines. *J Neuroimmunol* 99, 82-90.
- Imitola, J., Chitnis, T., Khoury, S.J., 2005. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther* 106, 163-177.



- Jensen, J., Langkilde, A.R., Frederiksen, J.L., Sellebjerg, F., 2006. CD8+ T cell activation correlates with disease activity in clinically isolated syndromes and is regulated by interferon-beta treatment. *J Neuroimmunol* 179, 163-172.
- Jilek, S., Schluep, M., Rossetti, A.O., Guignard, L., Le Goff, G., Pantaleo, G., Du Pasquier, R.A., 2007. CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol* 123, 105-113.
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 45, 1268-1276.
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., Vollmer, T., Weiner, L.P., Wolinsky, J.S., 1998. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 50, 701-708.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, A.H., 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1213-1222.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., Enk, A.H., 2001. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 22, 394-400.
- Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S., Ishikawa, I., Azuma, M., 2004. Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 172, 7306-7314.
- Kappos, L., Freedman, M.S., Polman, C.H., Edan, G., Hartung, H.P., Miller, D.H., Montalban, X., Barkhof, F., Radu, E.W., Bauer, L., Dahms, S., Lanius, V., Pohl, C., Sandbrink, R., 2007. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet* 370, 389-397.
- Karni, A., Abraham, M., Monsonego, A., Cai, G., Freeman, G.J., Hafler, D., Khoury, S.J., Weiner, H.L., 2006. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol* 177, 4196-4202.
- Karp, C.L., Biron, C.A., Irani, D.N., 2000. Interferon beta in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key? *Immunol Today* 21, 24-28.
- Khan, O.A., Zvartau-Hind, M., Caon, C., Din, M.U., Cochran, M., Lisak, D., Tselis, A.C., Kamholz, J.A., Garbern, J.Y., Lisak, R.P., 2001. Effect of monthly intravenous cyclophosphamide in rapidly deteriorating multiple sclerosis patients resistant to conventional therapy. *Mult Scler* 7, 185-188.
- Khoury, S.J., Guttman, C.R., Orav, E.J., Kikinis, R., Jolesz, F.A., Weiner, H.L., 2000. Changes in activated T cells in the blood correlate with disease activity in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 57, 1183-1189.
- Killestein, J., Hintzen, R.Q., Uitdehaag, B.M., Baars, P.A., Roos, M.T., van Lier, R.A., Polman, C.H., 2002. Baseline T cell reactivity in multiple sclerosis is correlated to efficacy of interferon-beta. *J Neuroimmunol* 133, 217-224.

- Kim, H.J., Ifergan, I., Antel, J.P., Seguin, R., Duddy, M., Lapierre, Y., Jalili, F., Bar-Or, A., 2004. Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 172, 7144-7153.
- Kirk, A.D., Blair, P.J., Tadaki, D.K., Xu, H., Harlan, D.M., 2001. The role of CD154 in organ transplant rejection and acceptance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 691-702.
- Koenen, H.J., Fasse, E., Joosten, I., 2003. IL-15 and cognate antigen successfully expand de novo-induced human antigen-specific regulatory CD4<sup>+</sup> T cells that require antigen-specific activation for suppression. *J Immunol* 171, 6431-6441.
- Krapf, H., Morrissey, S.P., Zenker, O., Zwingers, T., Gonsette, R., Hartung, H.P., 2005. Effect of mitoxantrone on MRI in progressive MS: results of the MIMS trial. *Neurology* 65, 690-695.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., Klinman, D.M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Bruck, W., 2002. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212.
- Kumar, M., Putzki, N., Limmroth, V., Remus, R., Lindemann, M., Knop, D., Mueller, N., Hardt, C., Kreuzfelder, E., Grosse-Wilde, H., 2006. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 180, 178-184.
- Kunitani, H., Shimizu, Y., Murata, H., Higuchi, K., Watanabe, A., 2002. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol* 36, 734-741.
- Kupersmith, M.J., Kaufman, D., Paty, D.W., Ebers, G., McFarland, H., Johnson, K., Reingold, S., Whitaker, J., 1994. Megadose corticosteroids in multiple sclerosis. *Neurology* 44, 1-4.
- Kurtzke, J., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452.
- Kurtzke, J., 1995a. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand* 161, 23-33.
- Kurtzke, J.F., 1975. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 51, 137-157.
- Kurtzke, J.F., 1995b. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand Suppl* 161, 23-33.
- Kuwana, M., 2003. [Blockade of CD40/CD154 signal as a therapeutic strategy for autoimmune diseases]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 26, 259-266.
- Lan, R.Y., Ansari, A.A., Lian, Z.X., Gershwin, M.E., 2005. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 4, 351-363.
- Lassmann, H., Vass, K., 1995. Are current immunological concepts of multiple sclerosis reflected by the immunopathology of its lesions? *Springer Semin Immunopathol* 17, 77-87.
- Leppert, D., Waubant, E., Burk, M.R., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 1996. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40, 846-852.
- Leussink, V.I., Jung, S., Merschdorf, U., Toyka, K.V., Gold, R., 2001. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 58, 91-97.

- Levings, M.K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., Roncarolo, M.G., 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105, 1162-1169.
- Lopez, C., Comabella, M., Al-zayat, H., Tintore, M., Montalban, X., 2006. Altered maturation of circulating dendritic cells in primary progressive MS patients. *J Neuroimmunol* 175, 183-191.
- Lu, H.T., Riley, J.L., Babcock, G.T., Huston, M., Stark, G.R., Boss, J.M., Ransohoff, R.M., 1995. Interferon (IFN) beta acts downstream of IFN-gamma-induced class II transactivator messenger RNA accumulation to block major histocompatibility complex class II gene expression and requires the 48-kD DNA-binding protein, ISGF3-gamma. *J Exp Med* 182, 1517-1525.
- Luc, G., Bard, J.M., Juhan-Vague, I., Ferrieres, J., Evans, A., Amouyel, P., Arveiler, D., Fruchart, J.C., Ducimetiere, P., 2003. C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease: the PRIME Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1255-1261.
- Ludewig, B., Krebs, P., Junt, T., Metters, H., Ford, N.J., Anderson, R.M., Bocharov, G., 2004. Determining control parameters for dendritic cell-cytotoxic T lymphocyte interaction. *Eur J Immunol* 34, 2407-2418.
- Lyons, A.B., 2000. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 243, 147-154.
- Lyons, A.B., Parish, C.R., 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171, 131-137.
- MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., Hart, D.N., 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512-4520.
- Manavalan, J.S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A.J., Vlad, G., Colombo, P.C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R., Suci-Foca, N., 2004. Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 16, 1055-1068.
- Martinez, A., de las Heras, V., Mas Fontao, A., Bartolome, M., de la Concha, E.G., Urcelay, E., Arroyo, R., 2006. An IFNG polymorphism is associated with interferon-beta response in Spanish MS patients. *J Neuroimmunol* 173, 196-199.
- Martínez-Cáceres, E., 1998. Controversias en la patogenia de la Esclerosis Múltiple. *Neuroinmunología* 2, 36-43.
- Marx, J., 1995. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science* 270, 232-233.
- Matyszak, M.K., Perry, V.H., 1996. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience* 74, 599-608.
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127.
- Mei, F.J., Osoegawa, M., Ochi, H., Minohara, M., Nan, S., Murai, H., Ishizu, T., Taniwaki, T., Kira, J., 2006. Long-term favorable response to interferon beta-1b is linked to cytokine deviation toward the Th2 and Tc2 sides in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 246, 71-77.

- Millefiorini, E., Gasperini, C., Pozzilli, C., D'Andrea, F., Bastianello, S., Trojano, M., Morino, S., Morra, V.B., Bozzao, A., Calo, A., Bernini, M.L., Gambi, D., Prencipe, M., 1997. Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome. *J Neurol* 244, 153-159.
- Miller, A., Galboiz, Y., 2002. Multiple sclerosis: from basic immunopathology to immune intervention. *Clin Neurol Neurosurg* 104, 172-176.
- Miller, D.H., Barkhof, F., Nauta, J.J., 1993. Gadolinium enhancement increases the sensitivity of MRI in detecting disease activity in multiple sclerosis. *Brain* 116 ( Pt 5), 1077-1094.
- Milligan, N.M., Newcombe, R., Compston, D.A., 1987. A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50, 511-516.
- Mills, K., 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4, 841- 855.
- Morris, J.H., 2000. El Sistema Nervioso Central: Enfermedades desmielinizantes. En: Cotran R, Kumar V, Collins T, eds. *Patología estructural y funcional*. 6ª.ed., Madrid, pp. 1373-1376.
- Moseman, E.A., Liang, X., Dawson, A.J., Panoskaltis-Mortari, A., Krieg, A.M., Liu, Y.J., Blazar, B.R., Chen, W., 2004. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 173, 4433-4442.
- Moser, M., De Smedt, T., Sornasse, T., Tielemans, F., Chentoufi, A.A., Muraille, E., Van Mechelen, M., Urbain, J., Leo, O., 1995. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 25, 2818-2824.
- Murzenok, P.P., Matusevicius, D., Freedman, M.S., 2002. gamma/delta T cells in multiple sclerosis: chemokine and chemokine receptor expression. *Clin Immunol* 103, 309-316.
- Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A.D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M.R., Sayegh, M.H., Khoury, S.J., 2003. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 112, 1037-1048.
- Navarro, J., Aristimuno, C., Sanchez-Ramon, S., Vigil, D., Martinez-Gines, M.L., Fernandez-Cruz, E., de Andres, C., 2006. Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: Differential short-term changes on corticosteroids therapy. *J Neuroimmunol*.
- Neuhaus, O., Kieseier, B.C., Hartung, H.P., 2006. Mitoxantrone in multiple sclerosis. *Adv Neurol* 98, 293-302.
- Neuhaus, O., Wiendl, H., Kieseier, B.C., Archelos, J.J., Hemmer, B., Stuve, O., Hartung, H.P., 2005. Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro. *J Neuroimmunol* 168, 128-137.
- Noseworthy, J.H., Gold, R., Hartung, H.P., 1999. Treatment of multiple sclerosis: recent trials and future perspectives. *Curr Opin Neurol* 12, 279-293.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952.
- Ochi, H., Feng-Jun, M., Osoegawa, M., Minohara, M., Murai, H., Taniwaki, T., Kira, J., 2004. Time-dependent cytokine deviation toward the Th2 side in Japanese multiple sclerosis patients with interferon beta-1b. *J Neurol Sci* 222, 65-73.
- Oliver, B., Mayorga, C., Fernandez, V., Leyva, L., Leon, A., Luque, G., Lopez, J.C., Tamayo, J.A., Pinto-Medel, M.J., de Ramon, E., Blanco, E., Alonso, A.,

- Fernandez, O., 2007. Interferon receptor expression in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 183, 225-231.
- Ota, M., Amakawa, R., Uehira, K., Ito, T., Yagi, Y., Oshiro, A., Date, Y., Oyaizu, H., Shigeki, T., Ozaki, Y., Yamaguchi, K., Uemura, Y., Yonezu, S., Fukuhara, S., 2004. Involvement of dendritic cells in sarcoidosis. *Thorax* 59, 408-413.
- Ozaki, Y., Amakawa, R., Ito, T., Iwai, H., Tajima, K., Uehira, K., Kagawa, H., Uemura, Y., Yamashita, T., Fukuhara, S., 2001. Alteration of peripheral blood dendritic cells in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 44, 419-431.
- Palace, J., 2001. Making the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71, II3-II8.
- Panitch, H., Goodin, D., Francis, G., Chang, P., Coyle, P., O'Connor, P., Li, D., Weinshenker, B., 2005. Benefits of high-dose, high-frequency interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis are sustained to 16 months: final comparative results of the EVIDENCE trial. *J Neurol Sci* 239, 67-74.
- Panitch, H., Miller, A., Paty, D., Weinshenker, B., 2004. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study. *Neurology* 63, 1788-1795.
- Park, H.B., Paik, D.J., Jang, E., Hong, S., Youn, J., 2004. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+CD25- T cells. *Int Immunol* 16, 1203-1213.
- Pasare, C., Medzhitov, R., 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033-1036.
- Pashchenkov, M.V., Pinegin, B.V., Link, K., Boiko, A.N., 2003. [Dendritic cells and their role in inflammation in the central nervous system]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 39-46.
- Pashenkov, M., Huang, Y.M., Kostulas, V., Haglund, M., Soderstrom, M., Link, H., 2001a. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 124, 480-492.
- Pashenkov, M., Huang, Y.M., Kostulas, V., Haglund, M., Soderstrom, M., Link, H., 2001b. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 124, 480- 492.
- Pashenkov, M., Teleshova, N., Link, H., 2003. Inflammation in the central nervous system: the role for dendritic cells. *Brain Pathol* 13, 23-33.
- Paty, D.W., Li, D.K., 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 43, 662-667.
- Petereit, H.F., Nolden, S., Schoppe, S., Bamborschke, S., Pukrop, R., Heiss, W.D., 2002. Low interferon gamma producers are better treatment responders: a two-year follow-up of interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 8, 492-494.
- Piccirillo, C., Thornton, A., 2004. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol* 25, 374- 380.
- Piemonti, L., Monti, P., Allavena, P., Sironi, M., Soldini, L., Leone, B.E., Socci, C., Di Carlo, V., 1999. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 162, 6473-6481.
- Polanczyk, M.J., Carson, B.D., Subramanian, S., Afentoulis, M., Vandenbark, A.A., Ziegler, S.F., Offner, H., 2004. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 173, 2227-2230.

- Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W.A., Silberberg, D.H., Tourtellotte, W.W., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13, 227-231.
- Puri, J., Arnon, R., Gurevich, E., Teitelbaum, D., 1997. Modulation of the immune response in multiple sclerosis: production of monoclonal antibodies specific to HLA/myelin basic protein. *J Immunol* 158, 2471-2476.
- Putheti, P., Morris, M., Stawiarz, L., Teleshova, N., Kivisakk, P., Pashenkov, M., Kouwenhoven, M., Wiberg, M.K., Bronge, L., Huang, Y.M., Soderstrom, M., Hillert, J., Link, H., 2003. Multiple sclerosis: a study of chemokine receptors and regulatory T cells in relation to MRI variables. *Eur J Neurol* 10, 529-535.
- Putheti, P., Pettersson, A., Soderstrom, M., Link, H., Huang, Y.M., 2004. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol* 24, 155-161.
- Resino, S., Navarro, J., Bellon, J.M., Gurbindo, D., Leon, J.A., Munoz-Fernandez, M.A., 2001. Naive and memory CD4+ T cells and T cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART. *Clin Exp Immunol* 125, 266-273.
- Rio, J., Nos, C., Tintore, M., Tellez, N., Galan, I., Pelayo, R., Comabella, M., Montalban, X., 2006. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 59, 344-352.
- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Liu, Y.J., 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.
- Rodriguez-Sainz Mdel, C., Sanchez-Ramon, S., de Andres, C., Rodriguez-Mahou, M., Munoz-Fernandez, M.A., 2002. Th1/Th2 cytokine balance and nitric oxide in cerebrospinal fluid and serum from patients with multiple sclerosis. *Eur Cytokine Netw* 13, 110-114.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., Levings, M.K., 2001a. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 68-79.
- Roncarolo, M.G., Levings, M.K., Traversari, C., 2001b. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 193, F5-9.
- Rott, O., Fleischer, B., Cash, E., 1994. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 24, 1434-1440.
- Rudick, R.A., Ransohoff, R.M., Lee, J.C., Peppler, R., Yu, M., Mathisen, P.M., Tuohy, V.K., 1998. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 50, 1294-1300.
- Rudick, R.A., Stuart, W.H., Calabresi, P.A., Confavreux, C., Galetta, S.L., Radue, E.W., Lublin, F.D., Weinstock-Guttman, B., Wynn, D.R., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandroock, A.W., 2006. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 911-923.
- Sacedon, R., Vicente, A., Varas, A., Jimenez, E., Munoz, J.J., Zapata, A.G., 1999. Glucocorticoid-mediated regulation of thymic dendritic cell function. *Int Immunol* 11, 1217-1224.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., Takahashi, T., 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182, 18-32.

- Salmaggi, A., Corsini, E., La Mantia, L., Dufour, A., Eoli, M., Milanese, C., Nespolo, A., 1997. Immunological monitoring of azathioprine treatment in multiple sclerosis patients. *J Neurol* 244, 167-174.
- Sánchez-Ramón, S., Aristimuño, C., Navarro, J., Jiménez, B., Rodríguez-Mahou, M., Rodríguez-Sáinz, C., Giménez-Roldán, S., Fernández-Cruz, E., De Andrés, C., 2004. Mature Dendritic Cells Subsets are recruited in Cerebrospinal Fluid and may be locally priming T-cells and recruiting regulatory T-cells at First Clinical Relapse of Multiple Sclerosis. In: ECTRIMS (Ed). *J Neurimmunol*, Vienne.
- Sanchez-Ramon, S., Navarro, A.J., Aristimuno, C., Rodriguez-Mahou, M., Bellon, J.M., Fernandez-Cruz, E., de Andres, C., 2005. Pregnancy-induced expansion of regulatory T-lymphocytes may mediate protection to multiple sclerosis activity. *Immunol Lett* 96, 195-201.
- Santambrogio, L., Strominger, J.L., 2006. The ins and outs of MHC class II proteins in dendritic cells. *Immunity* 25, 857-859.
- Sattler, M.B., Demmer, I., Williams, S.K., Maier, K., Merkler, D., Gadjanski, I., Stadelmann, C., Bahr, M., Diem, R., 2006. Effects of interferon-beta-1a on neuronal survival under autoimmune inflammatory conditions. *Exp Neurol* 201, 172-181.
- Sawcer, S., Jones, H.B., Feakes, R., Gray, J., Smaldon, N., Chataway, J., Robertson, N., Clayton, D., Goodfellow, P.N., Compston, A., 1996. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* 13, 464-468.
- Schmidt, M., Luger, N., Luger, A., Pauels, H.G., Schulze-Osthoff, K., Domschke, W., Kucharzik, T., 2001. Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol* 166, 1344-1351.
- Schmied, M., Duda, P.W., Krieger, J.I., Trollmo, C., Hafler, D.A., 2003. In vitro evidence that subcutaneous administration of glatiramer acetate induces hyporesponsive T cells in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol* 106, 163-174.
- Schreiber, S.L., Crabtree, G.R., 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13, 136-142.
- Sellebjerg, F., Christiansen, M., Jensen, J., Frederiksen, J.L., 2000. Immunological effects of oral high-dose methylprednisolone in acute optic neuritis and multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 7, 281-289.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Capello, E., Mancardi, G.L., Aloisi, F., 2006. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 124-141.
- Shodell, M., Siegal, F.P., 2001. Corticosteroids depress IFN-alpha-producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J Allergy Clin Immunol* 108, 446-448.
- Shodell, M., Siegal, F.P., 2002. Circulating, interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human ageing. *Scand J Immunol* 56, 518-521.
- Soilu-Hanninen, M., Laaksonen, M., Hanninen, A., Eralinna, J.P., Panelius, M., 2005. Downregulation of VLA-4 on T cells as a marker of long term treatment response to interferon beta-1a in MS. *J Neuroimmunol* 167, 175-182.
- Sonoda, K.H., Faunce, D.E., Taniguchi, M., Exley, M., Balk, S., Stein-Streilein, J., 2001. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol* 166, 42-50.

- Sorensen, P.S., Wanscher, B., Jensen, C.V., Schreiber, K., Blinkenberg, M., Ravnborg, M., Kirsmeier, H., Larsen, V.A., Lee, M.L., 1998. Intravenous immunoglobulin G reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 50, 1273-1281.
- Stasiolek, M., Bayas, A., Kruse, N., Wieczarkowicz, A., Toyka, K.V., Gold, R., Selmaj, K., 2006. Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Brain* 129, 1293-1305.
- Stassen, M., Fondel, S., Bopp, T., Richter, C., Muller, C., Kubach, J., Becker, C., Knop, J., Enk, A.H., Schmitt, S., Schmitt, E., Jonuleit, H., 2004. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 34, 1303-1311.
- Steinman, R.M., 2003. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* 51, 59-60.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C., 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.
- Stinissen, P., Raus, J., Zhang, J., 1997. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol* 17, 33-75.
- Sturzebecher, S., Wandinger, K.P., Rosenwald, A., Sathyamoorthy, M., Tzou, A., Mattar, P., Frank, J.A., Staudt, L., Martin, R., McFarland, H.F., 2003. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 126, 1419-1429.
- Tenembaum, S., Chamoles, N., Fejerman, N., 2002. Acute disseminated encephalomyelitis: a long-term follow-up study of 84 pediatric patients. *Neurology* 59, 1224-1231.
- Tennakoon, D.K., Mehta, R.S., Ortega, S.B., Bhoj, V., Racke, M.K., Karandikar, N.J., 2006. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 176, 7119-7129.
- Tintore, M., Rovira, A., Rio, J., Nos, C., Grive, E., Sastre-Garriga, J., Pericot, I., Sanchez, E., Comabella, M., Montalban, X., 2003. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. *Neurology* 60, 27-30.
- Tommasini, A., Ferrari, S., Moratto, D., Badolato, R., Boniotto, M., Pirulli, D., Notarangelo, L.D., Andolina, M., 2002. X-chromosome inactivation analysis in a female carrier of FOXP3 mutation. *Clin Exp Immunol* 130, 127-130.
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338, 278-285.
- Truyen, L., van Waesberghe, J.H., van Walderveen, M.A., van Oosten, B.W., Polman, C.H., Hommes, O.R., Ader, H.J., Barkhof, F., 1996. Accumulation of hypointense lesions ("black holes") on T1 spin-echo MRI correlates with disease progression in multiple sclerosis. *Neurology* 47, 1469-1476.
- Uehira, K., Amakawa, R., Ito, T., Tajima, K., Naitoh, S., Ozaki, Y., Shimizu, T., Yamaguchi, K., Uemura, Y., Kitajima, H., Yonezu, S., Fukuhara, S., 2002. Dendritic cells are decreased in blood and accumulated in granuloma in tuberculosis. *Clin Immunol* 105, 296-303.
- Upham, J.W., Denburg, J.A., O'Byrne, P.M., 2002. Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 32, 818-823.



- van Boxel-Dezaire, A.H., van Trigt-Hoff, S.C., Killestein, J., Schrijver, H.M., van Houwelingen, J.C., Polman, C.H., Nagelkerken, L., 2000. Contrasting responses to interferon beta-1b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: does baseline interleukin-12p35 messenger RNA predict the efficacy of treatment? *Ann Neurol* 48, 313-322.
- Van Parijs, L., Abbas, A.K., 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-248.
- van Walderveen, M.A., Kamphorst, W., Scheltens, P., van Waesberghe, J.H., Ravid, R., Valk, J., Polman, C.H., Barkhof, F., 1998. Histopathologic correlate of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology* 50, 1282-1288.
- Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Goldman, M., Willems, F., 1999. Inhibition of human dendritic cell functions by methylprednisolone. *Transplantation* 67, 1342-1347.
- Verhasselt, V., Vosters, O., Beuneu, C., Nicaise, C., Stordeur, P., Goldman, M., 2004. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* 34, 762-772.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-979.
- Vuckovic, S., Gardiner, D., Field, K., Chapman, G.V., Khalil, D., Gill, D., Marlton, P., Taylor, K., Wright, S., Pinzon-Charry, A., Pyke, C.M., Rodwell, R., Hockey, R.L., Gleeson, M., Tepes, S., True, D., Cotterill, A., Hart, D.N., 2004. Monitoring dendritic cells in clinical practice using a new whole blood single-platform TruCOUNT assay. *J Immunol Methods* 284, 73-87.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J.P., Cottrez, F., Groux, H., 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.
- Walker, L.S., Chodos, A., Eggena, M., Dooms, H., Abbas, A.K., 2003. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 198, 249-258.
- Waubant, E., Vukusic, S., Gignoux, L., Dubief, F.D., Achiti, I., Blanc, S., Renoux, C., Confavreux, C., 2003. Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 61, 184-189.
- Weiner, H.L., 1997. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* 48, 341-351.
- Weiner, H.L., 2001a. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 207-214.
- Weiner, H.L., 2001b. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 3, 947-954.
- Weiner, H.L., Mackin, G.A., Orav, E.J., Hafler, D.A., Dawson, D.M., LaPierre, Y., Herndon, R., Leirich, J.R., Hauser, S.L., Turel, A., et al., 1993. Intermittent cyclophosphamide pulse therapy in progressive multiple sclerosis: final report of the Northeast Cooperative Multiple Sclerosis Treatment Group. *Neurology* 43, 910-918.
- Weinshenker, B., Rodriguez, M., 1994. Epidemiology of multiple sclerosis. *Handbook of Neuroepidemiology*, 533-536 537.
- Weinshenker, B.G., 1996. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 14, 291-308.
- Weinshenker, B.G., Bass, B., Rice, G.P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers, G.C., 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically

- based study. 2. Predictive value of the early clinical course. *Brain* 112 ( Pt 6), 1419-1428.
- Wells, A.D., Gudmundsdottir, H., Turka, L.A., 1997. Following the Fate of Individual T Cells throughout Activation and Clonal Expansion. *J. Clin. Invest.* 100, 3173–3183.
- Wiendl, H., Hohlfeld, R., 2002. Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. *BioDrugs* 16, 183-200.
- Willoughby, E.W., Paty, D.W., 1988. Scales for rating impairment in multiple sclerosis: a critique. *Neurology* 38, 1793-1798.
- Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., Steinman, R.M., 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198, 235-247.
- Yednock, T.A., Cannon, C., Fritz, L.C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., Karin, N., 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 356, 63-66.
- Yilmaz, A., Weber, J., Cicha, I., Stumpf, C., Klein, M., Raithel, D., Daniel, W.G., Garlisch, C.D., 2006. Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 48, 70-80.
- Yong, V.W., Chabot, S., Stuve, O., Williams, G., 1998. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 51, 682-689.
- Yousry, T.A., Major, E.O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkiet, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., Barkhof, F., Radue, E.W., Jager, H.R., Clifford, D.B., 2006. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 354, 924-933.
- Zhang, Z., Wang, F.S., 2005. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Immunol* 2, 411-417.
- Zheng, S.G., Gray, J.D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S., Horwitz, D.A., 2002. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 169, 4183-4189.